Aus der Klinischen Abteilung des
Diabetes Forschungsinstituts an der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. F.A. Gries

DIE C-PEPTID-AUSSCHEIDUNG IM HARN BEI DIABETES MELLITUS

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Achim Hedtmann

1980

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0050

Aus der Klinischen Abteilung des
Diabetes Forschungsinstituts an der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. F.A. Gries

DIE C-PEPTID-AUSSCHEIDUNG IM HARN BEI DIABETES MELLITUS

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Achim Hedtmann

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Straßburg

Referent
gez.: Prof. Dr. Grüneklee

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Kley

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG: Insulin, seine Vorläufer, deren Spaltprodukte und ihr Verhalten in vivo und in vitro	1
1.1.	Entdeckung des Proinsulins	1
1.2.	Struktur von Proinsulin, Insulin und C-Peptid	2
1.2.1.	Struktur des Proinsulins	2
1.2.2.	Struktur des Insulins	4
1.2.3.	Struktur des C-Peptids	6
1.3.	Konversion des Proinsulins	7
1.4.	Sekretion von Insulin, C-Peptid und Proinsulin	8
1.5.	Biologische Wirkungen von Proinsulin und C-Peptid im Vergleich zur Insulinwirkung	9
1.5.1.	Biologische Proinsulinwirkungen	9
1.5.1.1.	Proinsulinwirkung in vitro	10
1.5.1.2.	Proinsulinwirkung in vivo	10
1.5.2.	Biologische Wirkungen des C-Peptids	10
1.6.	Degradation und Elimination von Insulin, C-Peptid und Proinsulin	11
1.6.1.	Degradation und Elimination des Insulins	11
1.6.2.	Degradation und Elimination des C-Peptids	13
1.6.3.	Degradation und Elimination des Proinsulins	13
1.7.	Verhalten von Proinsulin, Insulin und C-Peptid im Serum unter Stimulation	15
1.8.	Harnausscheidung von Proinsulin, Insulin und C-Peptid	20
1.8.1.	Insulinausscheidung im Harn	20
1.8.2.	Proinsulinausscheidung im Harn	22
1.8.3.	C-Peptidausscheidung im Harn	22

		Seite
1.9.	Antikörperbildung und Raumstruktur von Proinsulin, Insulin und C-Peptid	24
1.10.	Bedeutung des C-Peptids für die klinische Beurteilung der B-Zell-Funktion	26
2.	FRAGESTELLUNG	28
3.	UNTERSUCHUNGSMETHODIK	29
3.1.	Studienanordnung	29
3.2.	Untersuchungsablauf	31
3.3.	Probanden	32
4.	STATISTISCHE METHODEN	34
4.1.	Vergleich zwischen den Patientengruppen	34
4.2.	Beziehungen zwischen Insulin und C-Peptid	35
4.3.	Biologische Variabilität von Insulin und C-Peptid	35
5.	MEßMETHODEN	37
5.1.	Meßmethoden des Insulins	37
5.2.	Radioimmunoassay (RIA)	38
5.2.1.	Prinzip des Radioimmunoassay	38
5.2.2.	Der Insulin-Radioimmunoassay	40
5.2.3.	Der C-Peptid-Radioimmunoassay	40
6.	ERGEBNISSE DER MEßMETHODISCHEN UNTERSUCHUNGEN ZUM C-PEPTID-RADIOIMMUNOASSAY IM HARN	43
6.1.	Beeinflussungen des RIA durch das chemische Milieu	43
6.1.1.	pH-Wert-Einflüsse	43
6.1.2.	Einfluß unterschiedlicher Harnstoffkonzentrationen	44
6.1.3.	Einfluß variabler Osmolarität	45
6.1.4.	Einfluß variabler NaCl-Konzentrationen	46

		Seite
6.1.5.	Einfluß unterschiedlicher Albuminkonzentrationen	47
6.2.	Zuverlässigkeitstestung des C-Peptid-RIA im Harn	48
6.2.1.	Wiederfindungsversuche	49
6.2.2.	Verdünnungsreihen	49
6.2.3.	Intra- und Interassayvarianz des C-Peptid-Radioimmunoassay in Harn und Serum	51
7.	ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN	52
7.1.	Verhalten von CPR und IRI im Serum	52
7.1.1.	Tagesverlauf von C-Peptid und Insulin im Serum	52
7.1.2.	Anstieg der Serumkonzentrationen von C-Peptid und Insulin unter Stimulation	54
7.1.3.	C-Peptid/Insulin-Quotient	54
7.1.4.	Intraindividuelle Reproduzierbarkeit als Maß der biologischen Variabilität von C-Peptid und Insulin im Serum	56
7.1.5.	Korrelation von C-Peptid und Insulin im Serum	57
7.2.	C-Peptid-Ausscheidung im Harn	58
7.2.1.	Tagesausscheidung von C-Peptid im Harn	58
7.2.2.	C-Peptid-Harnausscheidung in Einzelfraktionen	60
7.2.3.	Basalausscheidung und stündliche C-Peptid-Ausscheidung im Harn	60
7.2.4.	Intraindividuelle Reproduzierbarkeit als Maß der biologischen Variabilität der C-Peptid-Ausscheidung im Harn	62
7.2.5.	Korrelation zwischen Serum- und Harn-C-Peptid	63
8.	DISKUSSION	66
8.1.	Untersuchungsablauf und Personen	66

		Seite
8.2.	Diskussion der methodischen Untersuchungen	67
8.3.	Diskussion der Ergebnisse der klinischen Untersuchungen	71
9.	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUßFOLGERUNGEN	82
10.	LITERATURVERZEICHNIS	84
11.	ANHANG (Tabellen und Abbildungen)	103

1. EINLEITUNG: Insulin, seine Vorläufer, deren Spaltprodukte und ihr Verhalten in vivo und in vitro

1.1. Entdeckung des Proinsulins

Nachdem die grundlegenden und wegweisenden Arbeiten von SANGER und Mitarbeitern 1955 dazu geführt hatten, nicht nur die komplette Struktur des Insulins, sondern damit auch die Struktur des ersten Proteins überhaupt, aufzuklären, begann in den folgenden Jahren die Forschung über die Biosynthese des Insulins.

LAZAROW et al. (1964) konnten nachweisen, daß das Insulin an den Ribosomen der B-Zelle synthetisiert wird; ergänzend wiesen TAYLOR und PARRY (1963) nach, daß die Insulinbiosynthese durch Puromycin, einen Hemmstoff der ribosomalen Proteinsynthese inhibiert werden kann.

Die komplizierte zweikettige Struktur des Insulins warf jedoch Probleme auf, die mit dem bekannten Wissen über den Ablauf von Proteinbiosynthesen nicht zu lösen waren, insbesondere war der Mechanismus der Verknüpfung von A- und B-Kette nicht erklärbar. Zwei Hypothesen standen sich lange gegenüber:

1. Die Insulinbiosynthese läuft stufenweise ab, so daß zuerst A- und B-Kette synthetisiert werden und in einem zweiten Schritt die Disulfidbrücken geknüpft werden, wofür bereits 1954 VAUGHN und ANFINSEN Hinweise geliefert hatten.
2. In Analogie zum damals bekannten Muster der Synthese des dreikettigen, also ebenfalls mehrkettigen Chymotrypsins wurde die Existenz eines einkettigen Prohormons des Insulins postuliert.

GIVOL et al. (1965) förderten die Suche nach einem einkettigen Insulinvorläufer, indem sie fanden, daß die Konstellation der Disulfidbrücken des Insulins nicht der thermodynamisch günstigsten Konformation entspricht und somit eine Verknüpfung zweier getrennt synthetisierter Ketten in vivo sehr unwahrscheinlich ist.

STEINER et al. (1967a) gelang dann der erste Nachweis des später als Proinsulin bezeichneten einkettigen Insulinvorläufers: Bei Inkubationsversuchen mit menschlichen, insulinproduzierenden Inselzelladenomen erschienen die dem Medium zugesetzten, radioaktiv markierten Aminosäuren in einem dem Insulin immunologisch ähnlichen Peptid von höherem Molekulargewicht. Nach 30 min. Inkubation zeigte sich die erste Radioaktivität im Insulinassay. Durch Behandlung mit Trypsin ließ sich das noch unbekannte Peptid in Insulin überführen.

Bereits im folgenden Jahr klärten CHANCE et al. (1968) die Struktur dieses Peptids auf und bewiesen damit die Richtigkeit der Hypothese von der einkettigen Synthesevorstufe des Insulins.

1.2. Struktur von Proinsulin, Insulin und C-Peptid

1.2.1. Struktur des Proinsulins

Proinsulin ist ein einkettiges Peptid, in dem die zwei Disulfidbrücken-gekoppelten Ketten des Insulins durch ein sogen. "connecting peptide" verbunden sind.

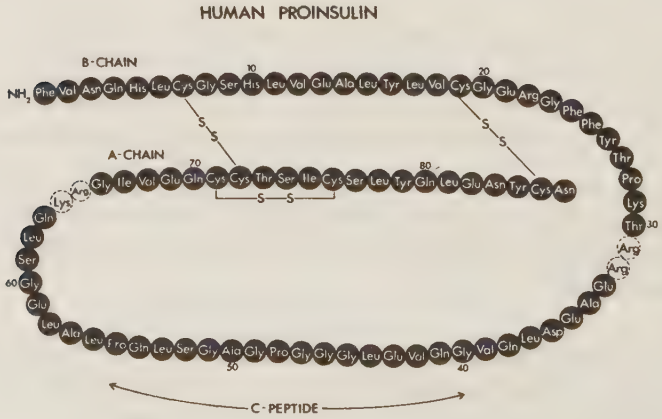

Abb. 1: Struktur des humanen Proinsulins (nach OYER et al. 1971)

Die Proinsuline der Säugetiere haben eine Kettenlänge zwischen 78 (Hund) und 86 Aminosäuren (Mensch, Pferd) (STEINER et al. 1973; CHANCE et al. 1968).

Die unterschiedliche Kettenlänge ist ausschließlich durch Unterschiede der connecting peptides bedingt.

Das Molekulargewicht des humanen Proinsulins beträgt ca. 9000 Dalton.

Der isoelektrische Punkt liegt bei 5,1 - 5,5 und ist somit fast mit dem des Insulins identisch (KOHNERT et al. 1972).

Die Tertiärstruktur des Proinsulins ist wahrscheinlich so gestaltet, daß die Konformation des Insulinanteils im Proinsulin weitgehend derjenigen des isolierten, abgespaltenen Insulins entspricht (STEINER et al. 1973).

Das connecting peptide hat im Proinsulin vermutlich eine wichtige Bedeutung für die Tertiärstruktur und ist somit möglicherweise für die korrekte Knüpfung der Disulfidbrücken verantwortlich.

Dafür spricht, daß das connecting peptide wesentlich länger ist als die Distanz von ca. 8 Å zwischen den Enden der A- und B-Kette (STEINER 1978). Eine vollständige Röntgenstrukturanalyse der Proinsulinkonformation, die diese Fragen klären könnte, ist allerdings bis heute nicht durchgeführt worden.

Ein indirekter Hinweis auf eine dem endgültigen, freien Insulinmolekül ähnliche Konformation innerhalb des Proinsulins ist die biologische Aktivität des Proinsulins in der Größenordnung von ca. 10 % der Insulinwirkung in vivo und in vitro.

Ebenso wie das Insulin bildet auch das Proinsulin Quartärstrukturen in Form von Oligomeren.
Dabei scheinen vor allem Dimere und Hexamere aufzutreten (FRANK und VEROS 1970; STEINER et al. 1973).

Nach einem Modell von BLUNDELL et al. (1972) sind die Proinsulinmoleküle im Hexamer mit den Histidinresten in Position 10 der B-Ketten in koordinativer Bindung auf zwei zentrale Zinkatome ausgerichtet. In dieser Konfiguration liegen die C-Ketten an der Peripherie des Oligopeptidkomplexes, ohne jedoch die Insulinfragmente zu maskieren.

Innerhalb des C-Peptids existieren keine intrachenaren Disulfidbrücken.

In der Primärstruktur des C-Peptids finden sich keine aromatischen Aminosäuren, insbesondere auch kein Tyrosin, was für die Jodmarkierung bei radioimmunologischen C-Peptid-Bestimmungen nachteilig ist.

1.2.2. Struktur des Insulins

Die bisher bekannten Insuline von Wirbeltieren sind speziesspezifisch, weisen jedoch eine bemerkenswert hohe chemische Homogenität auf.

Das Molekulargewicht der Säugetierinsuline liegt bei ca. 5800 Dalton (Rind: 5733, Schwein: 5777, Pferd: 5747). Allen Insulinen gemeinsam ist die zweikettige Konformation mit einer A- und einer B-Kette, die durch zwei Disulfidbrücken zwischen Cystinmolekülen verknüpft sind. die brückenbildenden Cystinreste treten konstant in Position 7 und 20 der A-Kette auf. Ebenso ist die intrachenare Disulfidbrücke zwischen Cystinresten in Position A6 und A11 invariant.

Die A-Ketten von Mensch, Schwein, Kaninchen und Hund sind identisch, ebenso die B-Ketten von Rind, Schwein, Pferd, Hund, Schaf. Die B-Kette von Mensch und Elefant ist ebenfalls identisch.

Die A-Ketten von Rind und Mensch unterscheiden sich in Position 10 (Mensch: Ile, Rind: Val). Humanes und Schweineinsulin unterscheiden sich in der terminalen B30-Aminosäure (Mensch: Ala,

Schwein: Thr). Die therapeutisch eingesetzten Insuline vom Schwein und Rind differieren also gegenüber dem humanen Insulin in 1 (Schwein) bzw. 3 (Rind) Aminosäureresten.

Der isoelektrische Punkt des Insulins liegt bei pH 5,4, der isoionische Punkt bei pH 5,6.

Beim Vergleich der bekannten Strukturen von tierischen Insulinen mit dem menschlichen Insulin konnten bislang Aminosäurevarianten in 27 Positionen (mit humanem Insulin als Referenzsubstanz) nachgewiesen werden, wobei in allen Fällen die biologische Aktivität im gleichen Test qualitativ erhalten blieb.

Einige charakteristische Strukturen haben sich jedoch als invariant erwiesen:

1. Die Konfiguration als zweikettiges Peptid
2. Die Positionen der Cystinreste
3. Die N- und C-terminalen Reste der A-Kette
4. Der hydrophobe Block aromatischer Aminosäuren in Position 23 - 27, nahe dem C-terminalen Ende der B-Kette.

Trotz all dieser Erkenntnisse ist es bis heute nicht gelungen, definitive Struktur-Wirkungsbeziehungen zwischen Insulinkonformation und seiner biologischen Aktivität herzustellen (KLOSTERMEYER und ZAHN 1971).

Beim Vergleich verschiedener Insulinderivate - etwa Desoligopeptidinsuline oder Acetylinsuline - mit dem nativen Insulin fiel eine verblüffende lineare Übereinstimmung zwischen relativer biologischer Aktivität und der Bindungsaffinität an zellständige Rezeptoren auf (GLIEMANN und GAMMELTOFT 1974).

1.2.3. Struktur des C-Peptids

Die in der angelsächsischen Literatur als connecting peptide bezeichnete C-Kette der bekannten Proinsuline zeichnet sich durch eine wesentlich höhere Speziesvariation aus, als dies vom Insulin bekannt ist. Humanes connecting peptide besitzt eine Kettenlänge von 35 Aminosäure(resten), die tierischen connecting peptides (inclusive der verbindenden basischen Aminosäuren) weisen zwischen 17 (Hund) und 35 (Mensch, Affe, Pferd, Ratte) Aminosäuren auf (TAGER und STEINER 1972).

Bei der Spaltung des humanen Proinsulins werden die basischen Aminosäuren Arg-Arg der Positionen 31 - 32 am C-terminalen Ende der B-Kette sowie Arg-Lys aus Position 62 - 63 am N-terminalen Ende der A-Kette freigesetzt, so daß neben dem Insulin ein Peptid mit 31 Aminosäuren entsteht, das C-Peptid.

Die Nomenklatur unterscheidet heute zwischen dem connecting peptide als Fragment innerhalb des intakten Proinsulinmoleküls und dem C-Peptid als Konversionsprodukt der Spaltung von Proinsulin.

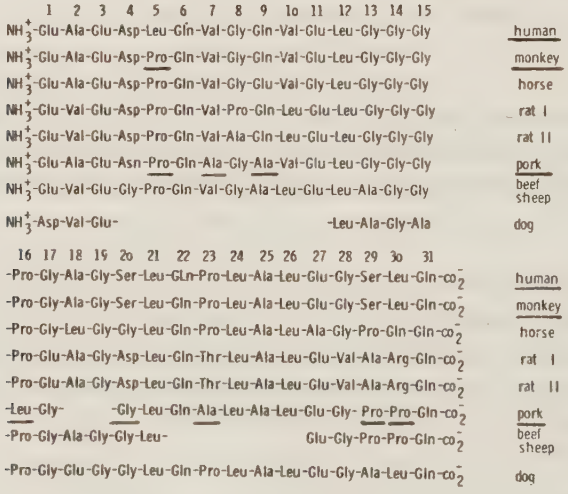

Abb. 2: Synopsis der Aminosäurensequenz verschiedener C-Peptide (nach BEYER et al. 1979)

Humanes C-Peptid und Schweine-C-Peptid bzw. Rinder-C-Peptid unterscheiden sich in 10 bzw. 14 Aminosäureresten. Hieraus resultiert die hohe immunologische Spezifität der C-Peptide (STEINER et al. 1976).

Das C-Peptid besitzt neben den Fibrinopeptiden die größte biologische Variabilität aller bekannten Proteine spezifischer Herkunft und Funktion. Dies ist als indirekter Hinweis auf die fehlende biologische Aktivität zu werten.

1.3. Konversion des Proinsulins

Die ausführlichsten und grundlegenden Arbeiten zum Mechanismus der Konversion des Proinsulins in Insulin und C-Peptid stammen von KEMMLER et al. (1971).

Hiernach läuft die Proinsulinspaltung über Zwischenstufen, sogen. Intermediate, ab. Von Bedeutung sind zwei gut charakterisierte Intermediate, das Intermediat I und II.

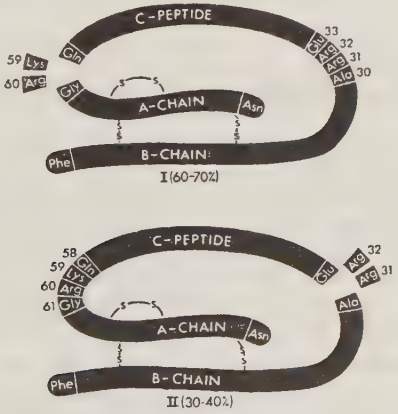

Abb. 3: Konversion des Proinsulins zu Insulin und C-Peptid: Die beiden Intermediate I und II (nach KEMMLER et al. 1971)

Bei der Konversion greift eine Trypsin-ähnliche Endopeptidase zwischen den basischen Aminosäuren der Position 60 des connecting peptides und Position 1 der A-Kette bzw. zwischen Position 32 und 33 des (bovinen) Proinsulins an. Resultat ist in beiden Fällen eine Kettenspaltung, die im weiteren durch eine Abspaltung der Aminosäuren 58 - 59 bzw. 31 - 32 durch eine Carboxypeptidase-B-ähnliche Exopeptidase zum Des-58-59-Proinsulin = Intermediat I oder zum Des-31-32-Proinsulin = Intermediat II führt. Nachfolgend entsteht durch erneute endopeptidatische Spaltung an Position 32/33 aus dem Intermediat I das Diarginyl-Insulin, das durch Exopeptidase-Umsetzung zu Insulin und C-Peptid konvertiert.

Aus dem Intermediat II resultiert durch Endopeptidase-Aktivität das Insulin sowie das LysArg-C-Peptid, das durch eine Exopeptidase (Trypsin-ähnlich) zu C-Peptid + Lys + Arg umgesetzt wird.

Geschwindigkeitsbestimmend ist die initiale endopeptidatische Spaltung an den Positionen 60/61 bzw. 32/33 des bovinen Proinsulins, wobei die Spaltung an Position 60/61 deutlich schneller abläuft, so daß ca. 60 - 70 % Intermediat I und 30 - 40 % Intermediat II entstehen.

1.4. Sekretion von Insulin, Proinsulin und C-Peptid

Nach der Konversion des Proinsulins zu Insulin und C-Peptid werden beide Peptide auf adäquate physiologische und pharmakologische Reize hin in äquimolaren Mengen sezerniert (KEMMLER et al. 1971; KEMMLER et al. 1972; KEMMLER et al. 1973; RUBENSTEIN et al. 1972a, Horwitz et al. 1975). Dieses konstante Sekretionsverhältnis zwischen Insulin und C-Peptid ist die notwendige Voraussetzung für die Brauchbarkeit des C-Peptids als Parameter der Insulinsekretion sowohl für klinische wie für wissenschaftliche Fragestellungen (BEISCHER et al. 1976). Neben Insulin und C-Peptid werden auch kleine Mengen Proinsulin sezerniert, die auf bislang nicht vollständig abgeklärtem Weg der Konversion entgehen. Nach TRACK et al. (1975) wird unter Normalbedingungen ca. 1 % des synthetisierten Proinsulins ohne vorherige Konversion

zu Insulin sezerniert.

Bei massiver Stimulation durch excessive Glucosekonzentrationen erhöht sich dieser Anteil auf bis zu 80 %. Dieser Befund ist als Überforderung des Konversionsmechanismus durch die extrem gesteigerte Synthese zu deuten.

Auch unter physiologischen Bedingungen kommt es, trotz des geringen Proinsulinanteils an den Sekretionsprodukten, zu einer beachtlichen Kumulation des Proinsulins im Serum, wofür in erster Linie die wesentlich längere Halbwertzeit verantwortlich ist.

Die klinische Bedeutung des Proinsulins liegt eher im diagnostischen Bereich, da das Proinsulin in hohem Ausmaß (abhängig vom verwendeten Antiserum) in allen Insulin-Radioimmunoassays kreuzreagiert. Auch C-Peptid-RIAs werden beeinflußt. Demgegenüber tritt die Stoffwechselwirkung des Proinsulins aufgrund der geringen biologischen Aktivität zurück und ist wohl nur von untergeordneter Bedeutung.

Lange umstritten war die Frage, ob es unter Stimulation zu einer präferentiellen Freisetzung älteren, bereits früher synthetisierten Insulins kommt oder nicht. Die meisten Autoren schließen sich heute der Ansicht von SANDO et al. (1973) an, wonach unter Stimulation keine bevorzugte Sekretion älteren Insulins erfolgt. Die gleichen Autoren zeigten jedoch auch, daß von dem unter Stimulation neugebildeten Insulin ein überproportionaler Anteil freigesetzt wird, der jedoch im Rahmen der gesamten sezernierten Insulinmenge auch nur sekundäre Bedeutung hat (SANDO et al. 1971).

1.5. Biologische Wirkungen von Proinsulin und C-Peptid im Vergleich zur Insulinwirkung

1.5.1. Biologische Proinsulinwirkungen

1.5.1.1 Proinsulinwirkung in vitro

In vitro Experimente zahlreicher Autoren zeigten in den verschiedensten biologischen Tests übereinstimmend eine Proinsulin-Aktivität von weniger als 10 % äquimolarer Insulinkonzentrationen (KEMMLER 1970a; NARAHARA 1972; GLIEMANN und SØRENSEN 1970).

Es bestehen keine qualitativen Unterschiede im Wirkungsprofil, die quantitativen und qualitativen Wirkungsunterschiede auf Muskel- und Fettgewebe sind gleich (CHALLONER und YU 1971), die Dosis-Wirkungskurven von Proinsulin und Insulin laufen parallel und zeigen gleiche Maxima.

1.5.1.2 Proinsulinwirkung in vivo

CHANCE et al. (1968) fanden im Konvulsionstest an Mäusen eine biologische in vivo Aktivität von ca. 20 % äquimolarer Insulindosen. Sie wiesen außerdem in Untersuchungen an Kaninchen nach, daß Proinsulin zu einer prolongierten Hypoglykämie führt, vergleichbar etwa dem zeitlichen Wirkungsprofil eines NPH-Insulins (CHANCE et al. 1971). Die meisten in vivo Studien mit Proinsulin zeigten eine qualitativ dem Insulin gleiche, quantitativ jedoch wesentlich geringere biologische Aktivität des Proinsulins.

1.5.2. Biologische Wirkungen des C-Peptids

Bis heute liegen keine Berichte oder Beobachtungen über eine in vivo Wirkung des C-Peptids beim Menschen vor. Es wird derzeit allgemein akzeptiert, daß das C-Peptid keine Stoffwechselfunktionen erfüllt.

Ebenso wenig ließen sich bei in vitro Versuchen Insulin-ähnliche oder insulinantagonistische Effekte nachweisen (GLIEMANN und SØRENSEN 1970; KITABCHI 1970).

Einzig zur Autoregulation der Insulinsekretion liegen zwei Arbeiten vor, die derzeit allerdings noch umstritten sind. Nach TOYOTA et al. (1975) und WOJCIKOWSKI et al. (1977) sowie WOJCIKOWSKI et al. (1978) übt das C-Peptid einen inhibitorischen Effekt auf die Insulinfreisetzung aus in Form eines negativen feed-back. Nach WOJCIKOWSKI et al. (1977) läßt sich die inhibitorische Wirkung noch dahingehend differenzieren, daß C-Peptid im wesentlichen auf die 2. Phase der Insulinfreisetzung wirkt, im Gegensatz zum Somatostatin, dessen Hauptangriffszeit die 1. Phase der Insulinfreisetzung sein soll.

WOJCIKOWSKI et al. (1977) wiesen zudem als einzige bisher eine ebenfalls inhibitorische Wirkung auf die Glukagon-Sekretion nach. Zu diesen Ergebnissen im Gegensatz stehen die Arbeiten von DUNBAR et al. (1976), wonach sich keine bioregulatorischen Effekte des C-Peptids nachweisen ließen.

Ein evolutionsgenetisches Argument gegen eine biologische Wirkung ist auch die erwähnte hohe Speziesspezifität der C-Peptide, da es sehr unwahrscheinlich ist, daß mögliche C-Peptid-Rezeptoren im Laufe der Evolution korrespondierende Veränderungen zu den Abweichungen der C-Peptid-Strukturen voneinander erfahren haben; ganz im Unterschied zum Insulin, dessen Struktur und vermutlich auch die entsprechenden Rezeptoreigenschaften einen gewissen evolutionsgenetischen Konservatismus aufweisen.

Näherliegend ist die Erklärung, daß die C-Peptid-Determinanten des genetischen Codes die bekannten Veränderungen im Laufe der Evolution erfahren konnten, ohne damit Selektionsnachteile in der Evolution oder sogar Letalfaktoren darzustellen, da das C-Peptid keine biologischen Wirkungen besitzt.

1.6. Degradation und Elimination von Insulin, C-Peptid und Proinsulin

1.6.1. Degradation und Elimination des Insulins

Umfassende und sehr sorgfältige Studien zur Insulindegradation

der verschiedenen Organe als Gewebshomogenate stammen von KITABCHI und STENTZ (1972). Danach ist die hepatische Degradationsrate für Insulin doppelt so hoch wie die des Pankreas oder der Niere. Bereits seit den Arbeiten von KAPLAN und MADISON (1959) sowie MORTIMORE et al. (1959) ist bekannt, daß ca. 50 % des via Portalvene der Leber zugeführten Insulins bei der ersten transhepatischen Passage eliminiert werden.

Die Niere ist das Organ mit der größten extrahepatischen Degradationskapazität. Nach weitgehend übereinstimmenden Berichten in der Literatur beläuft sich, wie RUBENSTEIN und SPITZ (1968) referierten, die renale arteriovenöse Konzentrationsdifferenz auf ca. 30 - 40 %.

So fanden CHAMBERLAIN und STIMMLER (1966) bei Patienten, denen zu diagnostischen Zwecken renal-arterielle und -venöse Katheter appliziert worden waren, für das Insulin eine arterio-venöse Differenz (avD) von 29 $\pm$ 12 %. Sie zeigten weiterhin, daß über 98 % des glomerulär filtrierten Insulins im proximalen Tubulus reabsorbiert und nachfolgend degradiert werden. Die im Harn verbleibenden Insulinmengen sind derart gering und in ihrer Relation zum Seruminsulin durch kaum erfaßbare, geringe Änderungen der proximal-tubulären Funktionen so stark variabel, daß das Insulin im Harn nach CHAMBERLAIN und STIMMLER (1966) als Parameter der Insulinsekretion bzw. des Seruminsulinspiegels nur sehr begrenzt brauchbar ist.

KATZ und RUBENSTEIN (1973) fanden in einer tierexperimentellen Studie an der Ratte eine renale avD von 40,5 %, die bei Serumkonzentrationen zwischen 2 und 25 ng/ml konstant blieb und auch darüber keine Sättigungskinetik erkennen ließ. Die absolute renale Extraktion des Insulins stieg bis zu einer Plasmakonzentration von 25 ng/ml linear mit der arteriellen Insulinkonzentration an. Der renale Anteil an der gesamten metabolic clearance rate (MCR) des Insulins betrug 33 %.

1.6.2. Degradation und Elimination des C-Peptids

Das bedeutendste Organ des C-Peptid-Katabolismus ist die Niere - im Unterschied zum Insulin.

KATZ und RUBENSTEIN (1973) ermittelten für das C-Peptid eine renale avD von 44 %. Die MCR blieb konstant bei Serumkonzentrationen zwischen 1 und 25 ng/ml, d.h. es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen renaler Extraktion und arterieller Konzentration des C-Peptids. Der renale Anteil an der gesamten MCR des C-Peptids betrug 69 %. Diese tierexperimentellen Befunde an der Ratte werden durch klinische Daten über das Verhalten des C-Peptids bei eingeschränkter Nierenfunktion zustimmend ergänzt. So stiegen die integralen Serum-C-Peptid-Werte von niereninsuffizienten Patienten im i.v. Glucosetoleranztest linear zur Einschränkung der Kreatininclearance unterhalb von 60 ml/min (WIESINGER et al. 1977). SIEGMUND et al. (1977) konnten bei ihren niereninsuffizienten Patienten um den Faktor 5 erhöhte Nüchternwerte i.S. und entsprechend erhöhte Werte unter Stimulation mit i.v. Glucose demonstrieren. KUZUYA et al. (1976) fanden die höchsten gemessenen Basalwerte i.S. bei urämischen Patienten, höher noch als bei Insulinträgern.

Im Gegensatz zum Insulin unterliegt das C-Peptid keiner oder einer sehr geringen hepatischen Degradation. STOLL et al. (1970c) konnten bei Untersuchungen an isoliert perfundierter Rattenleber keine hepatische C-Peptid-Elimination aufzeigen. Studien am Menschen von HORWITZ et al. (1975) bestätigen diese Ergebnisse, die weiterhin durch die klinischen Befunde an Patienten mit Leberzirrhose von JOHNSTON et al. (1976) gestützt werden. Diese Daten wurden 1978 nochmals durch JOHNSTON et al. bestätigt. Hingegen fanden RÖVENSTRUNCK et al. (1977) sowie KÖHL et al. (1978) eine zwar geringe, jedoch merklichehepatische C-Peptid-Elimination.

1.6.3. Degradation und Elimination des Proinsulins

Die Halbwertzeit (HWZ) des Proinsulins im peripheren Blut ist

wesentlich größer als die des Insulins (STOLL et al. 1970c; RUBENSTEIN et al. 1970; STARR und RUBENSTEIN 1974). Dies ist als Hinweis auf unterschiedliches Degradationsverhalten zu werten, da der Verteilungsraum für Insulin und Proinsulin gleich ist (TOMPKINS et al. 1971).

Trotz differenzierender Absolutwerte für die HWZ von Proinsulin und Insulin stimmt die Relation HWZ Proinsulin/HWZ Insulin mit 3 - 5 bei allen Untersuchungen gut überein. Der bemerkenswerteste Unterschied zum Insulinkatabolismus liegt - wie beim C-Peptid - in der geringen oder fehlenden hepatischen Elimination des Proinsulins.

STOLL et al. (1970c) fanden überhaupt keine hepatische Clearance des Proinsulins und RUBENSTEIN et al. (1972b) ermittelten eine 10 - 15mal geringere hepatische Extraktion als beim Insulin.

Dagegen fanden RUBENSTEIN et al. (1970) bei Hunden eine renale avD des Proinsulins zwischen 23 und 50 %. Nach KATZ und RUBENSTEIN (1973) beträgt die avD für das Proinsulin in der Rattenniere in vivo 36 %. Seine renale Extraktionsrate blieb konstant, die Extraktion korrelierte linear zur Serumkonzentration des Proinsulins. Der renale Anteil an der totalen MCR betrug 55 %. Die MCR des Proinsulins lag mit 6,7 $\pm$ 0,3 ml/min beträchtlich unter derjenigen des Insulins mit 16,4 $\pm$ 0,4 ml/min, jedoch immer noch um fast 50 % über der des C-Peptids mit 4,2 $\pm$ 0,2 ml/min.

Obwohl in der Literatur immer wieder die Theorie vertreten wurde, einmal sezerniertes Proinsulin könne zu Insulin und C-Peptid konvertiert werden, ist bis heute in keinem Fall der definitive Nachweis einer extrapankreatischen Konversion des Proinsulins gelungen (KITABCHI und STENTZ 1972; RUBENSTEIN et al. 1972a). Auch MASHITER und KING (1969), die aus ihren in vitro Experimenten eine spezifische Proinsulindegradation zu Insulin ableiteten, haben die Reaktionsprodukte nicht chemisch oder immunologisch definiert. Die einzige Arbeit mit analytischer Darstellung

der Degradationsprodukte stammt von LAZARUS et al. (1970). Hierbei wurden bei Trennung und Charakterisierung der Degradationsprodukte durch Polyacrylamid-Elektrophorese und Gelchromatographie weder Insulin und C-Peptid noch Intermediate nachgewiesen.

In der bereits zitierten Arbeit von KITABCHI und STENTZ (1972) wurde auch die Degradationskapazität verschiedener Organe für Proinsulin und Insulin verglichen. Dabei erreichten nur Pankreas- und Niergengewebshomogenate Proinsulindegradationsraten, die 10 % der jeweiligen Insulindegradationskapazität überschritten. (Pankreas: 18,3 bzw. 21,2 %, Niere: 18,8 bzw. 23,3 %)

Aus der verfügbaren Literatur läßt sich heute ableiten, daß die Proinsulindegradation Gesetzen des unspezifischen Peptidabbaus folgt, wobei keine definierte Konversion zu Insulin und C-Peptid auftritt.

Schlußfolgerungen zur biologischen und klinischen Bedeutung des Proinsulins im Serum sollten daher nur mit äußerster Vorsicht gezogen werden, insbesondere, wenn Stoffwechselwirkungen zu Insulin konvertierten Proinsulins diskutiert werden.

1.7. Verhalten von Proinsulin, Insulin und C-Peptid im Serum

1.7.1. Halbwertzeit von Proinsulin, Insulin und C-Peptid

Halbwertzeitbestimmungen der 3 Peptide wurden bis heute von mehreren Autoren durchgeführt, und zwar sowohl im Tiermodell wie auch beim Menschen. Eine Übersicht der verfügbaren Daten gibt die Tabelle 1.

Hieraus läßt sich als gesichert eine ca. 3 - 5fach höhere HWZ sowohl des C-Peptids wie des Proinsulins gegenüber dem Insulin ableiten.

Proinsulin	Insulin	C-Peptid	Spezies	Autoren
18	6	-	Meerschweinchen	STOLL et al. (1970c)
22	8	-	Pavian	dto.
25	4	-	Mensch	TOMPKINS et al. (1971)
14 - 22		-	Hund	RUBENSTEIN et al. (1970)
25,6	4,3	-	Mensch	SÖNKSEN et al. (1973)
17,2	4,8	-	Mensch	STARR et al. (1973)
18 - 25	3 - 4	-	Mensch	STARR und RUBENSTEIN (1974)
-	9,8	11,1	Mensch	HORWITZ et al. (1973)
-	-	20,1	Mensch	KUZUYA und MATSUDA (1976)
-	-	30	Mensch	FABER et al. (1976)
-	-	26,5	Mensch	KRAUSE (1977)
-	-	33,5	Mensch	FABER et al. (1978)

Tabelle 1: Halbwertzeitbestimmungen von Prosinsulin, Insulin und C-Peptid im peripheren Blut. Zahlenangaben in min.

1.7.2. Verhalten von Proinsulin, Insulin und C-Peptid im Serum unter Stimulation

Die Reaktion des Seruminsulins auf Stimulation mit Glucose oder Sulfonylharnstoffen ist heute gut erforscht, die Zahl der Publikationen kaum noch überschaubar (Übersicht bei MATSCHINSKY et al. 1975 und HALLMANN und TÄLJEDAL 1975).

Danach steigt die Konzentration des Seruminsulins im oralen Glucose-Toleranztest (OGTT) bei gesunden Probanden steil an, um nach ca. 30 min. ein Maximum zu erreichen, fällt dann ab und erreicht nach 3 Stunden wieder den Ausgangswert. Beim Diabetes mellitus vom Erwachsenentyp erfolgt die Insulinfreisetzung verzögert mit einem Maximum erst nach 90 oder 120 min. und fällt verspätet ab. Das Maximum liegt oft höher als bei Normalpersonen. Die relative Streuung der Insulinwerte im Serum von Gesunden ist 6mal größer als die der Blutglucose (YALOW 1976).

Studien zum Verhalten des C-Peptids unter Belastung sind wesentlich seltener. Angaben zur Relation C-Peptid/Insulin sind teilweise noch widersprüchlich.

Als gut gesichert gilt heute ein molarer C-Peptid/Insulin-Quotient von 5 - 15 unter Basalbedingungen, der unter Stimulation deutlich sinkt als Ausdruck eines relativ zum Ausgangswert stärkeren Insulinanstiegs, um sich mit nachlassendem Stimulationseffekt dem Ausgangswert wieder zu nähern (HEDING und MUNKGAARD RASMUSSEN 1975; KANEKO et al. 1975; KUZUYA et al. 1976; KRAUSE et al. 1976).

Dabei konnten enge Korrelationen zwischen C-Peptid- und Insulin-Serumspiegeln hergestellt werden (KANEKO et al. 1975; HORWITZ et al. 1975).

Die publizierten Daten über die Serumkinetik des C-Peptids unter Belastung sind noch widersprüchlich: HORWITZ et al. (1975), KRAUSE et al. (1976) sowie KANEKO et al. (1975) beschrieben im OGTT

einen diskordanten Verlauf mit gegenüber dem Insulin verspäteten C-Peptid-Maxima. KUZUYA et al. (1976), HEDING et al. (1975a) und GRÜNEKLEE et al. (1977) konnten Simultanmaxima von Insulin und C-Peptid im OGTT demonstrieren.

Ein weiteres Problem, das die Vergleichbarkeit der Resultate der verschiedenen Autoren stark beeinträchtigt, sind die erheblich differierenden Normalwerte, zum Teil sogar innerhalb einzelner Arbeitsgruppen. Eine Übersicht der Basalwerte des C-Peptids im Serum (Plasma) im RIA gibt die Tabelle 2.

C-Peptid-Basalwert (ng/m l)	Autoren
1,0 ± 0,23	BLOCK et al. (1971
1,3 ± 0,3	BLOCK et al. (1972)
2,1 ± 0,2	HORWITZ et al. (1972)
1,2 ± 0,2	HORWITZ et al. (1973)
3,54 ± 1,05	HORWITZ et al. (1975)
1,12 ± 0,21	HEDING et al. (1975a)
1,1 ± 0,3	HEDING et al. (1975b)
1,15 ± 0,33	HEDING (1977)
1,56 ± 0,09	JOHNSTON et al. (1978)
0,88 ± 0,21	KANEKO et al. (1974)
2,45 ± 0,96	KUZUYA et al. (1976)
2,13 ± 1,26	SIEGMUND et al. (1977)
2,04 : Broca 90	BEYER et al. (1977)
2,56 : Broca 90 - 110	dto.
3,03 : Broca 110	dto.

Tabelle 2: Basalwerte des C-Peptids im Serum (Plasma) von gesunden Normalpersonen

Der Vergleich der peripheren Proinsulinkonzentrationen mit dem Proinsulinanteil des Pankreas am gesamten IRI ergab deutliche Differenzen. Während in nicht pathologisch verändertem Pankreas der Proinsulinanteil des gesamten IRI zwischen 1 % und 10 % liegt (STEINER et al. 1968; RASTOGI et al. 1970; CHANCE 1971; LOCKWOOD und MISBIN 1972), fanden sich im peripheren Blut höhere Konzentrationen. Nach den Ergebnissen der meisten Autoren beträgt der Proinsulinanteil am totalen IRI ca. 20 %. So beschrieben MELANI et al. (1970) 5 - 48 % Proinsulinanteil bei gesunden Probanden, GORDEN et al. (1971) ca. 20 %, SHERMAN et al. (1972) weniger als 20 %, GUTMAN et al. 0 - 17 %. Nur KITABCHI et al. (1971) fanden mit 26 - 76 % weit höhere Anteile. Die verwendete Methode erwies sich jedoch später als unspezifisch (CRESTO et al. 1974; STARR et al. 1975).

Nach Stimulation steigen die Proinsulinkonzentrationen im Serum analog dem Insulin. Die Maxima werden annähernd gleichzeitig erreicht. Die absoluten Anstiege des Proinsulins sind jedoch beträchtlich niedriger als beim Insulin, so daß der Proinsulin/Insulin-Quotient unter Stimulation abfällt (MELANI et al. 1970; GORDEN und ROTH 1969; HEDING 1977). HEDING (1977) konnte nachweisen, daß nüchtern keine bedeutenden Unterschiede im relativen Proinsulinanteil bei Gesunden, Erwachsenendiabetikern mit relativem Hyperinsulinismus und insulinbedürftigen Diabetikern bestehen. Der Proinsulinanteil betrug 19, 23 und 16 %. Während jedoch bei den Erwachsenendiabetikern der Proinsulinanteil unter Stimulation absank wie bei Gesunden, stieg er bei insulinbedürftigen Diabetikern von 16 auf 31 % an. Der C-Peptid/Insulin-Quotient fiel bei Gesunden und Erwachsenendiabetikern von jeweils 7,9 auf 3,7 bzw. 3,2, wohingegen er bei den insulinbedürftigen Diabetikern ohne nennenswerte Insulinsekretion konstant 5,0 betrug.

In diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von HORWITZ et al. (1975) anzuführen. Sie bestimmten Proinsulin, Insulin und C-Peptid im peripheren und Portalvenenblut gesunder Probanden

unter Stimulation mit 25 g Glucose i.v. in 2 min. Dabei stiegen die Konzentrationen aller drei Peptide gleichzeitig nach 90 sec. im Portalvenenblut maximal an. Die peripheren Konzentrationen erreichten beim Proinsulin bereits nach 2,5 min. ihr Maximum, während der Insulin- und C-Peptid-Gipfel gleichzeitig nach 5 min. auftraten. Im Portalvenenblut betrug der Proinsulinanteil am gesamten IRI 6 % basal - ein Wert, der übrigens gut mit dem Proinsulingehalt des Pankreas am totalen IRI übereinstimmt - und fiel nach 2 min. auf 2 % ab, um nach 17 min. wieder auf ca. 4 % anzusteigen. In der Peripherie stieg der Proinsulinanteil von 12 % basal auf 17 % nach 2 min. und fiel dann bis zur 5. Minute steil auf 4 % ab. Nach 17 min. waren die Ausgangswerte wieder erreicht.

Aus den vorliegenden Informationen ist heute zu schließen, daß das Proinsulin im Serum einen beachtenswerten Anteil des gesamten immunreaktiven Insulins ausmacht, jedoch hat sich kein Hinweis auf eine besondere Bedeutung etwa eines veränderten Proinsulin/Insulin-Quotienten für die Pathogenese des Diabetes mellitus nachweisen lassen.

Die unbestrittene Bedeutung der Proinsulinbestimmung im Serum liegt in der Insulomdiagnostik, da fast alle (benignen und malignen) Insulome einen überproportionalen Anteil Proinsulin sezernieren.

1.8. Harnausscheidung von Insulin, Proinsulin und C-Peptid

1.8.1. Insulinausscheidung im Harn

JØRGENSEN wies als erster 1966 immunologisch reaktives Insulin im Harn nach. Die 24-Std-Exkretion betrug bei stoffwechselgesunden Personen 14000 µU (8000 - 30000 µU).

Insulinbedürftige Diabetiker schieden vor Beginn der Insulintherapie deutlich verringerte Insulinmengen aus, die mit Beginn einer adäquaten Therapie in den Normbereich der Kontrollgruppen

anstiegen. RUBENSTEIN et al. (1967a) ermittelten bei gesunden Probanden eine Insulinexkretion von 215 µU/h basal und von 834 µU/h unter Glucosebelastung. Die Harnclearance des Insulins lag zwischen 0,23 - 0,87 ml/min. In einer weiteren Arbeit ermittelten RUBENSTEIN et al. (1967b) eine Insulinclearance im Harn von 0,15 - 0,5 ml/min. Sie fanden ferner eine verringerte Clearance im 3. Trimester der Schwangerschaft (bei erhöhtem Serum-insulin), bei peripheren Gefäßerkrankungen sowie bei arterieller Hypertension.

Akromegale Patienten schieden jedoch, in Übereinstimmung mit den erhöhten Seruminsulinwerten, höhere Insulinmengen im Harn aus, die Clearance war unverändert.

Eine sehr sorgfältige und aufschlußreiche Arbeit zum Verhalten des Insulins in der Niere stammt von CHAMBERLAIN und STIMMLER (1967). Sie maßen an nierengesunden, nicht diabetischen Probanden eine avD von 29 $\pm$ 12 % - was sehr gut übereinstimmt mit den bereits erwähnten Resultaten von KATZ und RUBENSTEIN (1973) - und eine Harnclearance von 0,37 $\pm$ 0,18 ml/min.

Der Anteil des im Harn ausgeschiedenen Insulins erreichte bei Gesunden maximal 1,5 % des glomerulär filtrierten Insulins, stieg jedoch bei renalen Erkrankungen in variablem Ausmaß an. Weiteren Aufschluß der Mechanismen glomerulärer Filtration und tubulärer Reabsorption erbrachten RABKIN et al. (1972) in tierexperimentellen Untersuchungen an Hunden. Danach wird das fast vollständig glomerulär filtrierte Insulin größtenteils bereits im proximalen Tubulus reabsorbiert. Im distalen Tubulus findet keine Insulinreabsorption mehr statt.

EL-ALLAWY et al. (1976) wiesen nach, daß das im Harn bestimmte immunologisch reaktive Insulin fast vollständig mit dem im Bioassay an isolierten Fettzellen (Konversion ^{3}H-markierter Glucose zu ^{3}H-Lipiden) bestimmten Insulin übereinstimmte, also keine sonstige insulin like activity (ILA) im Harn erscheint.

Alle angeführten Arbeiten wiesen jedoch auf eine starke Abhängigkeit der Insulinausscheidung vom jeweiligen renalen Funktionszustand hin. Da außerdem nur geringe Mengen in der Größenordnung von ca. 0,1 % der Tagessekretion des Pankreas ausgeschieden werden, können sich minimale Schwankungen der renalen Funktionen stark verfälschend auswirken, insbesondere, wie bereits CHAMBERLAIN und STIMMLER (1967) anmerkten, auf die Repräsentanz des Harninsulins für das Seruminsulin.

Die unkontrollierbare Verschlechterung der Insulinclearance bei vaskulären Erkrankungen und arteriellem Hochdruck (RUBENSTEIN et al. 1967b), die beide dem Diabetes mellitus überproportional assoziiert sind, bewirken eine weitere Einschränkung der Aussagekraft der Insulinbestimmung im Harn, die auch nicht durch eine genaue Kontrolle des renalen Funktionszustandes, wie von RUBENSTEIN et al. (1967b) gefordert, nochmals ausgeglichen werden kann.

1.8.2. Proinsulinausscheidung im Harn

Zur Proinsulinausscheidung im Harn liegen nur zwei Arbeiten vor: einerseits von RUBENSTEIN, CHO und STEINER (1968), die jedoch nur die Darstellung des Proinsulins im Harn erwähnt und keine Angaben zur Menge, der Clearance und einer möglichen klinischen Bedeutung macht; andererseits von CONSTAN et al. (1970), die eine Proinsulinausscheidung im Harn von Gesunden von 0,72 $\pm$ 0,29 uU/Kg/h bzw. 0,92 $\pm$ 0,42 uU/mg Creatinin maßen. Der Proinsulinanteil am gesamten immunreaktiven Insulin betrug 11,9 %. Die Messung erfolgte im Insulinassay nach Separation.

1.8.3. C-Peptidausscheidung im Harn

KANEKO et al. konnten bei der klinischen Testung ihres im Vorjahr eingeführten Doppelantikörper-RIA C-Peptid im Blut, Urin, Liquor und Ascites nachweisen (KANEKO et al. 1975). Im OGTT fanden sie eine deutliche Stimulierbarkeit der C-Peptidausscheidung im

Harn von basal 2882 ng/2 Std. auf 9165 ng/2 Std. Unter Tolbutamidbelastung stieg die Ausscheidung von 1624 ng/Std. auf 4303 ng/Std. Serum-C-Peptid und Harnausscheidung waren signifikant miteinander korreliert.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen GRÜNEKLEE und HEDTMANN (1977) bei Tolbutamidbelastung. KUZUYA et al. (1976) fanden in ihrem Untersuchungskollektiv gesunder Probanden eine tägliche Ausscheidung von ca. 90 µg. Unter Zugrundelegung des Insulinbedarfs Totalpankreatektomierter errechneten sie eine renale Exkretion von 13 - 20 % der Tagessekretion an C-Peptid.
Korrigiert auf das Körpergewicht betrug die Ausscheidung 1,52 ± 0,55 µg/kg KG und in Relation zum Kreatinin im Harn 55,1 ± 18,2 µg/mg Kreatinin.

1978 maßen KUZUYA et al. 81 ± 36 µg CPR-Exkretion im Harn von Gesunden, 45 ± 21 µg bzw. 64 ± 35 µg im Harn von normalgewichtigen bzw. übergewichtigen Erwachsenendiabetikern und 8 ± 6 µg bei juvenilen Diabetikern über 24 Stunden.

Bemerkenswerterweise erwies sich die C-Peptid-Clearance bei Nierenkranken im Bereich einer Kreatinin-Clearance von 6 - 190 ml/min als konstant (HORWITZ et al. 1975), d.h. die renale C-Peptidausscheidung ist in weiten Grenzen von der Nierenfunktion unabhängig. HORWITZ et al. (1977) erklären dies mit einer glomerulotubulären Balance für das C-Peptid in dem Sinne, daß die bei Niereninsuffizienz erhöhten Serum-C-Peptidwerte zu einer - bezogen auf das einzelne Glomerulum - erhöhten glomerulären Filtration führen, die wiederum eine erhöhte Reabsorption in den assoziierten Tubuli bedingt. Dieses Postulat stimmt gut überein mit den Untersuchungen von WIESINGER et al. (1977), die bei niereninsuffizienten Patienten mit einer Kreatinin-Clearance von weniger als 60 ml/min einen umgekehrt proportionalen Anstieg des Serum-C-Peptids fanden.

Bestätigt werden diese Ergebnisse durch REGUER und BINDER (1976), die bei ihren Patienten ebenfalls eine negative Korrelation

zwischen Kreatinin-Clearance und Serum-C-Peptid fanden sowie die höchsten gemessenen Werte bei Nephrektomierten.

KUZUYA et al. (1978) fanden bei zwei Patienten mit Cadmium-Nephropathie ebenfalls eine unveränderte CPR-Ausscheidung im Harn bei gleichzeitig exzessiver Exkretion von $ß_2$-Mikroglobulin, ein weiterer Hinweis auf die relative Stabilität der renalen C-Peptid-Exkretion, allerdings zeigten die gleichen Autoren auch eine Verschlechterung der Korrelation zwischen dem Serum-CPR und dem Harn-CPR bei Nephropathien gegenüber Gesunden.

1.9. Raumstruktur von Proinsulin, Insulin und C-Peptid und Antikörperbildung

Da sowohl das Insulin wie auch das C-Peptid Fragmente des Proinsulins sind, ist aus theoretischen Überlegungen eine Kreuzreaktion von Insulin- und C-Peptid-Antikörpern mit den korrespondierenden Anteilen des Proinsulinmoleküls denkbar. Diese Überlegung wird noch gestützt durch die Untersuchungen zur Raumstruktur des Proinsulins (siehe Kapitel 2), die - obwohl die Tertiärstruktur noch nicht vollständig aufgeklärt ist - bereits heute den Schluß zulassen, daß beide Peptidkettenanteile im Proinsulin von der räumlichen Konfiguration her immunologisch zugänglich sind. Bereits 1969 konnten RUBENSTEIN et al. (1969b) Kreuzreaktionen unterschiedlichen Ausmaßes zwischen Insulin und Proinsulin im Insulin-Radioimmunoassay nachweisen. Andererseits arbeiteten STOLL et al. (1970a) und RUBENSTEIN et al. (1969a) mit einem Proinsulinantikörper, der ausschließlich Kreuzreaktionen mit dem C-Peptid zeigte.

In der Literatur ist nur ein einziger spezifischer Proinsulinantikörper ohne Insulin- oder C-Peptid-Kreuzreaktionen erwähnt (STOLL et al. 1970b). Dieser Antikörper muß gegen das Areal der verbindenden basischen Aminosäurenpaare zwischen Insulin- und C-Peptid-Anteil des Proinsulins gerichtet sein. Alle anderen Autoren arbeiteten bei der getrennten Bestimmung von Proinsulin, Insulin und C-Peptid mit aufwendigen Trennungs-

methoden wie Gelfiltration, Dünnschichtchromatographie oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Übersicht bei KEMMLER 1973).

Ebenso zeigen alle bis heute bekannten Insulinantikörper Kreuzreaktionen unterschiedlichen Ausmaßes mit dem Proinsulin, deren Anteil meist mit 25 - 50 %, in Einzelfällen bis 100 %, angegeben wird (Übersicht bei KEMMLER 1973). Die zur Zeit verfügbaren C-Peptid-Antiseren weisen Proinsulin-Kreuzreaktivität zwischen 11 und 143 % auf (FABER et al. 1978).

Aus den erwähnten Daten ist ersichtlich, daß, abgesehen von der Publikation von STOLL et al. (1970), bis heute kein proinsulinspezifischer Antikörper zur Verfügung steht, so daß die immunologischen Bestimmungsmethoden für die drei Peptide mit nur zwei Antikörpern - gegen C-Peptid und Insulin - durchgeführt werden.

Die Gewinnung von Insulinantikörpern ist kein Problem, da Rinder- oder Schweineinsulin bei der Immunisierung z.B. von Meerschweinchen eine ausreichende Immunogenität bei sehr guter Kreuzreaktivität der entstehenden Antikörper mit humanem Insulin zeigen.

Die Produktion von Antikörpern gegen humanes C-Peptid bereitet dagegen weit mehr Schwierigkeiten, denn die in der analytischen Forschung als großer Vorteil geschätzte Spezi sspezifität des C-Peptids bringt andererseits große präparative Schwierigkeiten bei der Herstellung von Human-C-Peptid-Antikörpern mit sich: Die Immunisierung mit humanem C-Peptid ist unabdingbar. So immunisierten MELANI et al. (1970) denn auch mit aus menschlichen Pankreata gewonnenem C-Peptid, ein sehr aufwendiges Verfahren, da die Ausbeute wegen der sehr schnell einsetzenden Autolyse des Pankreas nur gering ist (OYER et al. 1971). So war es ein großer Fortschritt, als es NAITHANI (1972) und YANAIHARA et al. (1974) gelang, humanes C-Peptid zu synthetisieren, das dann von KANEKO et al. (1974) zur Entwicklung eines Doppelantikörper-RIA für humanes C-Peptid benutzt wurde.

Das zur Immunisierung benutzte synthetische C-Peptid entspricht dem connecting peptide des Prosinsulins, ist also ein Arg-Lys-C-Peptid-ArgArg.

1.10. Bedeutung des C-Peptids für die klinische Beurteilung der B-Zell-Funktion

Die herausragende Bedeutung der C-Peptid-Bestimmung im Serum wurde anfänglich in der Möglichkeit gesehen, die endogene Sekretionsreserve insulinbehandelter Diabetiker zu messen, da das C-Peptid ein dem Insulin äquimolar assoziiertes Sekretionsprodukt des Pankreas ist. So beschäftigten sich denn auch die ersten klinischen Arbeiten zum C-Peptid von BLOCK et al. (1972) und BLOCK et al. (1973) mit dem Serum-C-Peptid bei Diabetikern in Relation zu Kontrollgruppen sowie mit Verlaufsstudien zur Insulinsekretion unter exogener Insulintherapie. Insulinbestimmungen sind bei diesen Patienten nicht möglich, da exogenes und endogenes Insulin im RIA zu fast 100 % interferieren. Die ursprünglichen optimistischen Hoffnungen, mit dem CPR-RIA einen einfachen Test der B-Zell-Funktion unter Insulintherapie in der Hand zu haben, sind gedämpft worden, da sich die Hinweise in der Literatur häufen, daß als Reaktion auf exogenes Insulin gebildete Antikörper mit dem C-Peptid-RIA interferieren (BLOCK et al. 1972; FINK et al. 1974; KUZUYA et al. 1977; BEISCHER et al. 1977; KRAUSE et al. 1976):
Die Insulinantikörper binden das in geringen Konzentrationen vorhandene Proinsulin an den insulindeterminanten Stellen des Moleküls und führen aufgrund ihrer hohen HWZ zu einer beträchtlichen Kumulation von noch C-Peptid-reaktivem Proinsulin. Im C-Peptid-RIA werden entsprechend hohe Werte gemessen, die zu falschen Rückschlüssen auf noch vorhandene Sekretionskapazitäten führen könnten. Unter Stimulation fällt dann allerdings der fehlende Anstieg des CPR i.S. auf, die sog. Sekretionsstarre, und gibt damit einen Hinweis auf die zugrunde liegende methodische Störung.

Eine Domäne der C-Peptidbestimmung im Serum eröffnet sich in der Insulomdiagnostik (HORWITZ et al. 1976; CORDES et al. 1977;

BEYER et al. 1977; KRAUSE et al. 1977; SENATOR et al. 1977), wo der fehlende Anteil des Serum-C-Peptids im i.v. Insulintoleranztest zusätzliche Informationen zum Hungertest liefert.

Selten, diagnostisch jedoch absolut beweisend, sind die niedrigen oder unmeßbaren C-Peptidwerte bei exzessiven Insulinwerten im Falle einer Hypoglycaemia factitia durch exogenes Insulin.

Interessante Perspektiven über zukünftige Bedeutungen des C-Peptids für die klinische Diagnostik wiesen WÖLK et al. (1977) und BEISCHER et al. (1978) auf:
Bei der Untersuchung von 36 Patienten im kombinierten i.v. Glucose-Glibenclamid-Test zeigte sich eine deutliche prognostische Überlegenheit der C-Peptid-Bestimmung im Serum gegenüber der Insulinbestimmung hinsichtlich der Entscheidung zur Sulfonylharnstoff- oder Insulintherapie. Diese Daten blieben allerdings nicht unwidersprochen, denn nach KNICK und PANITZ (1977) läßt sich aus der Serum-C-Peptidbestimmung im i.v. Glucose-Glibenclamid-Test keine im Informationsgehalt der Insulinbestimmung prognostisch überlegene Aussage ableiten.

Das C-Peptid im Harn wurde als Insulinäquivalent von KUZUYA et al. (1976) und KUZUYA et al. (1978) zur Kontrolle der C-Peptid-Sekretion unter Glucosebelastung sowie bei tageszeitlichen Schwankungen eingesetzt. MIROUZE et al. (1978) verfolgten anhand einer wieder ansteigenden C-Peptidausscheidung im Harn die Remissionsperiode in der Initialphase des juvenilen Diabetes mellitus.

2. FRAGESTELLUNG

Untersuchungsziele dieser Arbeit waren:

1. Die Beziehungen zwischen C-Peptid und Insulin im Serum unter den Bedingungen physiologischer, nahrungsbedingter Stimulation bzw. Behandlung mit Sulfonylharnstoffen und/oder Biguaniden eines Diabetes mellitus.
2. Methodische Voraussetzungen für eine C-Peptidbestimmung im Harn zu erarbeiten.
3. Die C-Peptidausscheidung im 24-Std-Harn von Gesunden, nicht insulinbedürftigen und insulinbedürftigen Diabetikern unter physiologischer nahrungsvermittelter Stimulation und ggf. oraler oder Insulintherapie zu ermitteln und zum Serum-C-Peptid und -Insulin in Beziehung zu setzen.
4. Die biologische Variabilität und damit die intraindividuelle Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der unter 1. und 3. angeführten Untersuchungen durch repetitive Untersuchung an sechs Tagen festzustellen.

3. UNTERSUCHUNGSMETHODIK

3.1. Studienanordnung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Darstellung des Verhaltens der korrespondierenden Peptide Insulin und C-Peptid im Serum im Tagesverlauf und deren Vergleich mit dem neu hinzugekommenen Parameter des C-Peptids im Harn. Dabei war zu berücksichtigen, daß das C-Peptid und Insulin im Serum jeweils als momentane Konzentrationen gemessen werden, das C-Peptid im Harn jedoch die Kumulation des über einen gewissen Zeitraum ausgeschiedenen Peptids erfaßt. Dies führte dazu, den Harn der untersuchten Personen in mehreren Fraktionen zu sammeln und andererseits im Verlauf jeder Sammelfraktion (Ausnahme: Nachtfraktion) mindestens einmal Blut abzunehmen.
Die Untersuchung erfolgte an 3 Kollektiven:

1. Stoffwechselgesunde Personen als Kontrollkollektiv (KO) (n = 8).
2. Diabetiker mit relativem Insulinmangel, d.h. sog. Erwachsenendiabetiker, deren Therapie aus Diät allein oder in Kombination mit Sulfonylharnstoffen besteht (ED) (n = 5).
3. Diabetiker mit absolutem Insulinmangel, die auf therapeutische Gaben exogenen Insulins angewiesen sind, sog. insulinbedürftige Diabetiker (ID) (n = 5).

Zwar ist aus prinzipiellen Erwägungen nicht anzunehmen, daß sich der Insulin-C-Peptid-Metabolismus gesunder Personen und solcher mit gestörter Kohlehydrattoleranz qualitativ anders verhält, sofern keine spezifischen Organschäden (siehe 3.3.) hinzutreten, jedoch ist dies nicht vollständig gesichert. Zum anderen sind für das Studium des Zusammenhangs von Insulin und C-Peptid im Serum sowie des C-Peptids im Harn Insulin- und C-Peptidwerte in einem möglichst großen Wertebereich wünschenswert.

Da eine künstliche Veränderung der Insulin- und C-Peptidwerte am Probanden jedoch ausscheidet, wurde die Erweiterung des

Wertbereichs durch die gezielte Aufnahme der drei Kollektive in die Studie angestrebt.
Vor allem aber bestand auch die Notwendigkeit, aufzuzeigen, daß die bei Gesunden gefundenen Zusammenhänge zwischen Insulin und C-Peptid im Serum und C-Peptid im Harn auch bei Diabetikern bestehen bzw. welche eventuellen Abweichungen gefunden werden.

Ein weiteres Ziel der Studie war die Untersuchung der individuellen Variabilität der gemessenen Parameter über einen bestimmten Zeitraum. Dabei sollte vor allem die biologische Variabilität, wie sie sich aus endogenen und exogenen, schwer erfaßbaren Faktoren wie der Auswirkung kontrainsulinärer Hormone, körperlicher Aktivität und sonstiger Streßbelastung ergibt, erfaßt werden. Deshalb wurden für jeden Probanden alle Untersuchungen an 6 verschiedenen Tagen wiederholt.
Hier stellte sich das Problem einer konstanten Ernährung, um keine Veränderungen der gemessenen Werte durch Abweichungen der kalorischen und Kohlenhydratbilanz zu erhalten.
Unter der Vorstellung eines spontan weitgehend ausbalancierten Verhältnisses aller denkbaren Faktoren untereinander, das durch gezielte Eingriffe nur tendenziell gestört werden könnte, wurde bei den gesunden Probanden auf eine konstante Diät verzichtet,die aus den genannten Gründen eher verfälschend als präzisierend sich ausgewirkt hätte, da sie manipulierend in physiologische Regulationsverhältnisse eingegriffen hätte.
Bei den untersuchten diabetischen Patienten wurde jedoch die Diät über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant gehalten, da hier ja die kontrollierte Kohlenhydrat- und Kalorienzufuhr Teil der therapeutischen Einwirkungen auf den Glucose- und Insulinstoffwechsel sind und somit nicht registrierte Veränderungen leicht einen schwer erklärbaren Trend in die Untersuchungsergebnisse bringen könnten.
Alle Patienten wiesen im Untersuchungszeitraum die beste erreichbare Einstellung ihres Diabetes auf.

3.2. Untersuchungsablauf

Alle untersuchten Personen sammelten an 6 verschiedenen, nicht obligat aufeinanderfolgenden Tagen innerhalb eines individuellen Zeitraums von max. 15 Tagen den 24-Std-Harn in 4 Fraktionen:

I: 7 - 13 h	II: 13 - 19 h
III: 19 - 23 h	IV: 23 - 7 h

Gleichzeitig wurde an den betreffenden Tagen peripheres Venenblut um 7, 10, 14 und 21 h entnommen.
Alle Probanden waren angewiesen, vor Ende einer Sammelperiode die Blase nochmals vollständig zu entleeren, so daß die in einem Intervall ausgeschiedenen Urinmengen auch entsprechend gesammelt wurden und nicht fälschlich die folgende Fraktion belasteten.
Diät (siehe 3.1.), orale Sulfonylharnstoff- und Insulintherapie wurden ebenfalls über den Untersuchungszeitraum konstant gehalten.

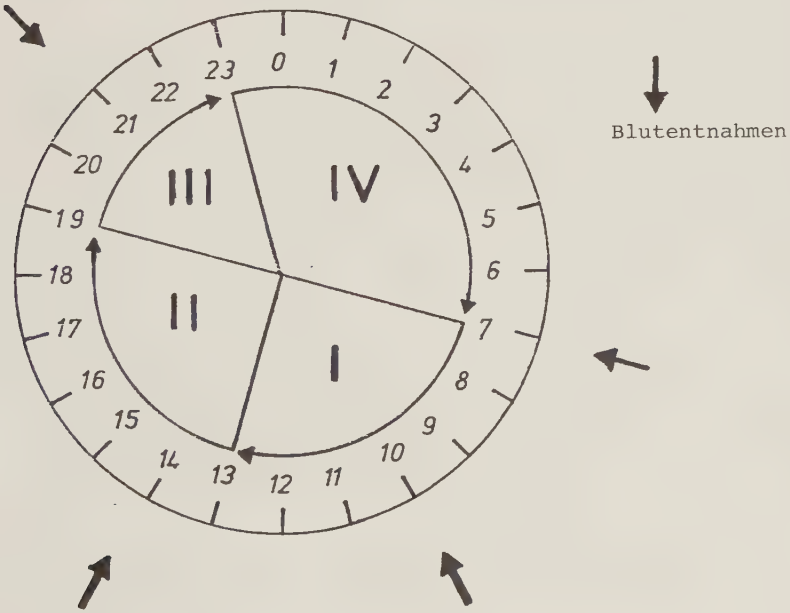

Abb. 4: Schema des Untersuchungsablaufes (I-IV: Harn-Sammelfraktionen)

Die Lagerung des Sammelharns während einer Sammelperiode erfolgte bei +4°C. Zum Ende der Periode wurde das Volumen bestimmt, der Harn zentrifugiert und danach in Plastikgefäßen mit 20 ml Inhalt bei -20°C tiefgefroren.
Wenn in Einzelfällen der Harn nicht sofort weiterverarbeitet wurde, erfolgte Lagerung bei +4°C für einige Stunden.
Die Blutproben wurden nach ca. 30minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Serum abpipettiert und ebenfalls bei -20°C tiefgefroren.
Alle Harn- bzw. Serumproben eines Patienten wurden im selben RIA-Ansatz einer einheitlichen Charge innerhalb 2 - 6 Wochen nach Gewinnung gemessen.

3.3. Probanden

Aus den schon unter 3.1. angeführten Gründen wurden neben stoffwechselgesunden Probanden auch noch Diabetiker vom Erwachsenentyp ohne Insulinbedürftigkeit und insulinbedürftige Diabetiker untersucht.
Die Auswahl erfolgte nach folgenden Kriterien:
Als Erwachsenendiabetiker galten Patienten mit einem nicht insulinbedürftigen, diätetisch und mit oraler Gabe von Sulfonylharnstoffen gut einstellbaren Diabetes mellitus mit Erstmanifestation im Erwachsenenalter (nach dem 25. Lebensjahr).
Die Gruppe der insulinbedürftigen Diabetiker wurde nur nach den Kriterien der Therapiebedürftigkeit mit exogenem Insulin zusammengestellt, berücksichtigte jedoch nicht das Manifestationsalter. Es war dabei berücksichtigt, daß keine Patienten mit Schäden an Organen mit hoher Degradationsrate für C-Peptid und/oder Insulin in die Untersuchung aufgenommen wurden. Dies bedeutete im Falle des Insulins den Ausschluß von Patienten mit manifesten Lebererkrankungen, wobei geringe Erhöhungen der Transaminasen SGOT, SGPT und yGT, wie sie z.B. auch im Rahmen einer diabetischen Fettleber auftreten, toleriert wurden, sofern keine Bilirubin- und a.P.-Erhöhungen vorhanden waren.
Weitere Voraussetzung für die Aufnahme in eines der Untersuchungskollektive war eine intakte Nierenfunktion, um auszuschließen,

daß derartige Störungen sowohl die C-Peptid-Konzentration im Serum durch eine veränderte Degradationsrate wie auch die Harnkonzentration durch unterschiedliche Exkretionsraten hätten beeinflussen können. Die Beurteilung erfolgte anhand der folgenden Laborparameter: Kreatinin und Harnstoff im Serum, Urin-Analyse und Urin-Sediment-Untersuchung.
Patienten mit erhöhten Serum-Kreatinin- oder Harnstoff-Werten bzw. Erythrozyturie, Proteinurie oder Bakteriurie wurden nicht berücksichtigt.
Die individuellen Daten der Untersuchten sind im tabellarischen Anhang, Tabelle 10, aufgeführt.

4. STATISTISCHE METHODEN

4.1. Vergleich zwischen den Patientengruppen

Der Vergleich zwischen den Patientengruppen bezüglich IRI im Serum und CPR in Serum und Harn erfolgt je Tageszeitpunkt bzw. je Harnfraktion mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse. Dabei gehen nicht die Einzelwerte, sondern die Mittelwerte der an 6 verschiedenen Tagen wiederholten Messungen je Proband in die Varianzanalysen ein.
Ein solches Vorgehen setzt voraus, daß über den Zeitverlauf der 6 verschiedenen, nicht obligat aufeinanderfolgenden Tage keine Trendentwicklung aufgrund geänderter Kohlenhydrat- oder Kalorienzufuhr, Pharmaka oder endokrinologischer Veränderungen usw. eingetreten ist.
Diese Voraussetzung eines fehlenden Trends ist für die Zielparameter vorab mit Hilfe von zweifachen Varianzanalysen (bezüglich der Einflußfaktoren Untersuchungstag und Proband) überprüft worden. Hierbei stellte sich heraus, daß die Voraussetzung der Trendabwesenheit für die Bildung von Mittelwerten über die 6 Untersuchungstage je Proband bei allen Zielparametern erfüllt ist.[+] Somit ist aufgrund der 6fachen Untersuchung jedes Probanden die Erweiterung von $n = 18$ auf $n = 18 \times 6 = 108$ statistisch zulässig.
Alle statistischen Signifikanzangaben beruhen auf der 1 %-Grenze d.h. $p < 0{,}01$.
Die Verteilungen von IRI und CPR sind nicht symmetrisch, sondern linkssteil mit einer relativen Standardabweichung (Variationskoeffizient = VK) größer als 33 %. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Variablen IRI und CPR eher logarithmisch-normalverteilt als arithmetisch-normalverteilt sind. Deshalb sind sämtliche statistischen Auswertungen von IRI und CPR mit logarithmischen Werten durchgeführt worden. Die wiedergegebenen Mittelwerte sind daher keine arithmetischen, sondern geometrische Mittelwerte mit entsprechenden Streuungsangaben.

[+] Die zweifachen Varianzanalysen können ggf. beim Verfasser zur Einsicht angefordert werden

4.2. Beziehungen zwischen IRI und CPR

Die Analyse des Zusammenhanges zwischen IRI und CPR im Serum einerseits und CPR in Serum und Harn andererseits erfolgt mit Hilfe einer einfachen Korrelationsanalyse für alle drei Kollektive zusammen (vgl. 3.1.) . Um dabei nicht rein technisch Opfer einer immerhin denkbaren Scheinkorrelation zu werden, erfolgen alle Korrelationsanalysen zusätzlich für die einzelnen Kollektive. Jeder Proband wird in der Korrelationsanalyse mit seinen an 6 verschiedenen Tagen wiederholten IRI- und CPR--Bestimmungen berücksichtigt. Da im Verlauf der Untersuchung kein Trend über die 6 Tage feststellbar war (s.o.) ist es bei der Auswertung der Ergebnisse statistisch erlaubt, sie als 6 voneinander unabhängige Wertepaare anzusehen, auch wenn sie theoretisch untereinander abhängig sind (vom gleichen Probanden). Unabhängig von dieser Vorgehensweise ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, daß die Induktionsbasis dieser Untersuchung durch die Anzahl der Probanden und nicht durch die Anzahl der Insulin- respektive C-Peptid-Bestimmungen gegeben ist.

Zu diesem methodischen Kompromiß sah sich der Verfasser aus organisatorischen und Kapazizätsgründen veranlaßt, um im Rahmen derselben Untersuchung auch noch die Frage der intraindividuellen Reproduzierbarkeit bearbeiten zu können.

Um die CPR-Ausscheidung im Harn mit den aus Einzelbestimmungen ermittelten CPR- und IRI-Spiegeln im Serum vergleichen zu können, wurde nach einem Parameter gesucht, der die Vergleichbarkeit von Harn- und Serumwerten für den jeweiligen Zeitraum erlaubt. Für solche Zwecke hat sich die Flächenberechnung unter den Serumkurven eingebürgert. Diese soll jedoch nicht als Integral im engen mathematischen Sinn verstanden werden, denn eineige neuere Erkenntnisse der Endokrinologie schränken eine solche Interpretation ein:

Die meisten Hormone, so auch das Insulin, werden diskontinuierlich in Form des sog. "spiking" freigesetzt. Einzelne Meßpunkte sind somit nicht repräsentativ für längere Zeiräume, sondern können nur als für das Konzentrationsniveau des jeweiligen Hormons hinweisend angesehen werden.
Eben dies wurde mit 4 Einzelbestimmungen pro Tag angestrebt. Das spezifische Verhalten der beiden Peptide begünstigt noch dieses Verfahren: Die CPR-Konzentrationen liegen 5-15mal so hoch wie beim IRI (ca. 3fache HWZ), so daß dem Insulin äquimolare Mengen sich beim "spiking" nur gering auswirken. Die freigesetzten Insulinmengen werden bereits in der Leber zu ca. 50 % gebunden, so daß in der Peripherie die Einflüsse des "spiking" auch gepuffert erscheinen.

4.3. Biologische Variabilität von IRI und CPR

Die biologische Variabilität, d.h. die im Längsschnitt über 6 Untersuchungstage erfaßten Veränderungen von CPR und IRI, erlaubt durch ihre Bestimmung zwei Aussagen:

1. die Schwankungsbreite der gemessenen Parameter unter annähernd konstanten Ausgangsbedingungen aufzuzeigen.
2. die Zuverlässigkeit einer isolierten Bestimmung der gemessenen Parameter zu erfassen, da die üblichen endogenen Abweichungen bekannt sind.

Die biologische Variabilität ist somit ein Maß der individuellen Reproduzierbarkeit eines Meßwertes. Als statistisches Maß hierfür wurde der intraindividuelle Variationskoeffizient (iVK) gewählt, d.h. die relative Standardabweichung des gemessenen Mittelwertes der 6 Einzelwerte an 6 verschiedenen Tagen.

5. MESSMETHODEN

5.1. Meßmethoden des Insulins

Auf dem Gebiet der Diabetologie und hier besonders bei der Erforschung der Wirkungen und des Metabolismus des Insulins spielten initial die sog. Bioassays eine bedeutende Rolle. Allen diesen Tests gemeinsam war, daß sie bestimmte Stoffwechselwirkungen physiologischer oder biochemischer Art unter der Einwirkung von insulinhaltigem Serum bzw. Plasma in vivo oder in vitro maßen. Die in vivo Tests benutzten als Indikator entweder das Auftreten zentraler hypoglykämischer Krämpfe bei Kaninchen und Mäusen oder die Blutzuckererniedrigung unter Einwirkung insulinhaltiger Extrakte bei Mäusen und Ratten. Weitere Bioassays benutzten die Glykogensynthese im Zwerchfell als Indikator der Insulinwirkung in vivo.

Die in vitro Tests maßen die Glucoseaufnahme des inkubierten Rattendiaphragmas bzw. -hemidiaphragmas oder bestimmten die Stoffwechselwirkungen des Insulins am epididymalen Fettgewebe der Ratte, z.B. die Glucoseoxidation von Glucose-1-C^{14} oder den Glucoseumsatz zu Laktat oder Glykogen.

Diese Methoden waren teilweise von beachtlicher Präzision, jedoch sehr aufwendig und störanfällig, so daß sie fast ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt wurden.

Da außerdem jede Arbeitsgruppe ihren Assay entsprechend den spezifischen Bedingungen kalibrieren mußte, waren die Ergebnisse nur sehr begrenzt untereinander vergleichbar. Zudem stellte sich mit heraus, daß die gemessenen Parameter keineswegs ausschließlich und spezifisch vom Insulin beeinflußt wurden, sondern Corticoide, Katecholamine, ACTH, STH und Glukagon sowie weitere Substanzen beträchtliche Störfaktoren darstellten. Außerdem unterschieden die meisten Assays nicht zwischen ILA (insulin like activity) und NSILA (non suppressible insulin like activity). Die Gesamtheit dieser beeinflussenden Faktoren führte zu

den stark divergierenden Normalwerten der verschiedenen Arbeitsgruppen sowie zu den weit höher als heute liegenden Meßergebnissen. Eine Übersicht über die Insulin-Bioassays findet sich bei LYNGSØE (1965) und FAULHABER und DITSCHUNEIT (1975).

Deshalb bedeutete es einen gewaltigen Fortschritt für die gesamte endokrinologische Forschung, als YALOW und BERSON (1960) den ersten Radioimmunoassay entwickelten - als Insulinassay. Der Radioimmunoassay (RIA) stellte sich in den folgenden Jahren als die grundlegende Methode der Erforschung des Verhaltens der Peptid- und später auch der Nichtpeptidhormone heraus.

5.2. Radioimmunoassays

5.2.1. Prinzip des Radioimmunoassay

Im Radioimmunoassay (RIA) konkurriert eine antigen wirkende Substanz mit einer Referenzsubstanz bekannter Konzentration und gleicher Immunreaktivität um die Bindung an einen spezifischen Antikörper. Dabei ist im Idealfall die Avidität des Antikörpers für Referenzantigen wie unbekanntes Antigen identisch.

Die Antikörper werden durch Immunisierung von Tieren hergestellt. Im Assay ist die Menge des verfügbaren Antikörpers begrenzt. Deshalb führt die Antigen-Antikörper-Reaktion zu einem Verhältnis von AK-gebundenem Referenzantigen zu AK-gebundenem gesuchten Antigen, das nur vom Konzentrationsverhältnis der beiden Antigene zueinander abhängig ist. Die Menge des AK-gebundenen Referenzantigens ist also ein Maß für die Konzentration des gesuchten Antigens. Die Identifizierung des gebundenen Referenzantigens (oder je nach Assay auch des freien Referenzantigens) erfolgt durch radioaktive Markierung.

Die Markierung geschieht im allgemeinen durch

a) Jodierung eines Tyrosylrestes mit J^{125}- oder J^{131}-Isotopen,

b) Einbau von H^3- oder C^{14}-Isotopen in Moleküle,

c) einen zusätzlichen J^{125}- oder J^{131}-Tyrosylrest.

Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der Aktivität der Probe mit derjenigen einer standardisierten Verdünnungsreihe anhand einer sog. Standardkurve. Hierbei wird - oft in halblogarithmischem Maßstab - die Aktivität des freien zu der des gebundenen Antiges (F/B), gebundenen Antigens zur Aktivität eines Nullansatzes (B/B_o) oder die Aktivität des gebundenen bzw. freien Antigens zur Totalaktivität (B/T bzw. F/T) aufgetragen.

Voraussetzung ist die Trennung des gebundenen vom freien Antigen. Diese erfolgt meistens mit physikalischen Techniken.

Gebräuchlich sind:

I. Präzipitationsmethoden

1. Doppelantikörpermethode:
   In einem zusätzlichen Inkubationsschritt wird ein präzipitierender Antikörper gegen das spezifische Antiserum zugefügt und der entstehende Doppelantikörperkomplex kann durch einfaches Zentrifugieren abgetrennt werden.

2. Aussalztechniken:
   Die unterschiedliche Lösungsfähigkeit des benutzten Solvens (meist Wasser) für Ag und AgAk-Komplex ausnutzend wird ein Salz hinzugefügt und der hochmolekulare AgAk-Komplex präzipitiert aufgrund seiner geringeren Löslichkeit.

3. Präzipitation mit organischen Lösungsmitteln:
   Die unterschiedliche Löslichkeit von freiem und gebundenem Antigen in Wasser bzw. unpolaren Lösungsmitteln führt zur Ausfällung. Verwendet werden Alkohole, Dioxane Trichloressigsäure.

II. Solid-phase-Techniken

1. Das nach der Inkubation noch freie Antigen wird an meist homogen dispergierte Substanzen adsorbiert. Verfahrensgrundlage ist die unterschiedliche physikalische Adsorption von freiem und gebundenem Antigen an oberflächen-

aktive Substanzen. Gebräuchlich sind Cellulosen, Aktivkohle, Silikate, Ionenaustauscher.

2. Eine Modifizierung des solid-phase-Prinzips stellen RIAs dar, bei denen schon primär an Sephadex oder mit der Oberfläche der Reagenzgefäße gekoppelte Antikörper verwendet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Radioimmunassays arbeiteten nach verschiedenen Trenntechniken:

1. Der Insulin-RIA benutzt an Sephadex gekoppelte Antikörper, eine Variante der solid-phase-Technik.
2. Der C-Peptid-RIA bedient sich der Doppelantikörpertechnik. Beide Trennungen erfolgen letztendlich durch Zentrifugieren.

5.2.2. Der Insulin-Radioimmunoassay

Der an Sephadex gekoppelte Insulin-Antikörper des Insulin-RIA (Fa. Pharmacia Diagnostics, Phadebas Insulin Test) stammt vom Meerschweinchen.

Als Tracer dient Insulin-J^{125} vom Schwein mit einer spezifischen Aktivität von 3 uCi bei 8 ng.
Der Meßbereich liegt zwischen 3,0 und 320 uU/ml. Es wird im Serum gemessen.

5.2.3. Der C-Peptid-Radioimmunoassay

Im C-Peptid-RIA (Fa. Byk-Mallinckrodt) wird ein gegen synthetisches humanes C-Peptid gerichteter Antikörper vom Kaninchen mit einem Titer von 1 : 10000 eingesetzt. Das als Standard, Tracer und zur Immunisierung benutzte synthetische C-Peptid entspricht der C-Kette im intakten humanen Proinsulin, ist also ein ArgArg-C-Peptid-LysArg.

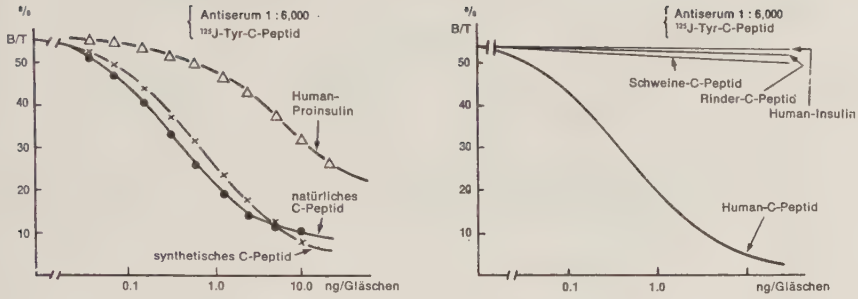

Abb. 5: Standardkurve des synthetischen humanen C-Peptids (nach KANEKO et al. 1974)

Wie Abb. 5 aus der Arbeit von KANEKO et al. (1974) zeigt, besteht fast vollständige Kreuzreaktivität mit nativem humanen C-Peptid, so daß immunreaktive Identität angenommen werden kann. Humanes Proinsulin zeigt auf Gewichtsbasis Kreuzreaktionen von weniger als 10 %. Tierische C-Peptide zeigen keine Kreuzreaktionen.

Der Anti-Kaninchenglobulin-Antikörper stammt von der Ziege, Titer 1 : 100. Der Meßbereich der Assays liegt zwischen 0,195 und 50 ng/ml. Reagenzien und Schema des Reaktionsablaufs sind aus Abb. 6 ersichtlich.

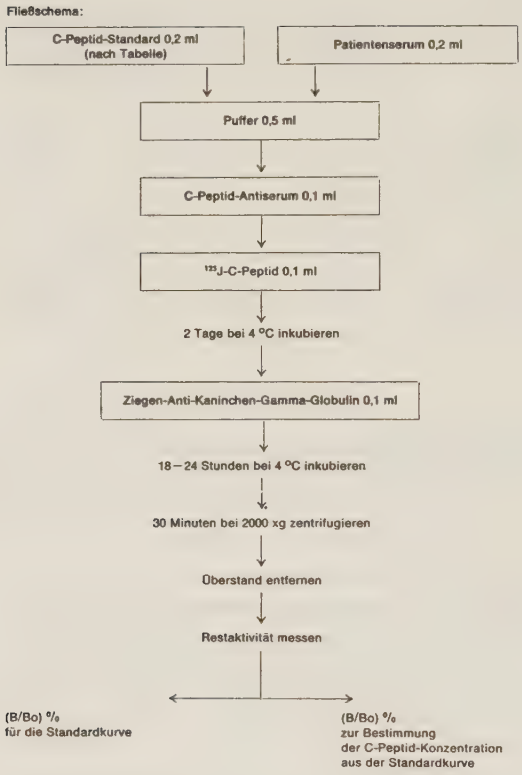

Abb. 6: Reaktions- und Arbeitsablauf des C-Peptid-RIA

6. ERGEBNISSE DER MEßMETHODISCHEN UNTERSUCHUNGEN ZUM C-PEPTID-RADIOIMMUNOASSAY IM HARN

6.1. Beeinflussungen des RIA durch das chemische Milieu

Radioimmunologische Untersuchungen im Harn unterscheiden sich von solchen im Serum dadurch, daß viele im Serum oder Plasma in engen Grenzen konstant gehaltene Parameter stark schwanken. Da es bekannt ist, daß verschiedene Faktoren des chemischen Milieus systematische Veränderungen der Meßergebnisse hervorrufen (YALOW und BERSON 1972), wurde der C-Peptid-RIA auf seine Beeinflußbarkeit durch verschiedene variable Parameter geprüft:

1. pH-Wert
2. Harnstoffkonzentration
3. Osmolarität
4. NaCl-Konzentration
5. Albumin-Konzentration.

Bei diesen methodischen Studien wurde einzig der zu untersuchende Parameter variiert, während alle anderen Faktoren konstant blieben. Jeder einzelne methodische Test wurde in Form eines Wiederfindungsversuches ausgeführt, d.h. eine bestimmte Menge synthetischen C-Peptids wurde in Phosphatpufferlösung (pH 7,4, 0,5 % Humanalbumin) eingewogen und bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen, variabler Osmolarität und verschiedenen NaCl-Konzentrationen gemessen. Bei der Untersuchung auf Albumin-Abhängigkeit des Assays wurde nur mit Phosphatpuffer gearbeitet, dem die jeweils entsprechende Menge Albumin zugefügt wurde. Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurde der pH-Wert des Puffers durch Variation von Salz- und Säureanteil verändert.

6.1.1. pH-Wert-Einflüsse

Der pH-Wert der Proben wurde durch Variieren des Säure/Salz-Verhältnisses des Puffers eingestellt. Es wurde mit 2 verschiedenen Konzentrationen eingewogenen synthetischen C-Peptids gearbeitet: 1,5 ng/ml und 4,5 ng/ml. Jede Probe wurde sechsfach

bestimmt, der errechnete Mittelwert zur Auswertung herangezogen.

pH	eingewogenes C-Peptid (4,5 ng/ml)	(%)	eingewogenes C-Peptid (1,5 ng/ml)	(%)
7,4	4,0	88,8	1,35	90,0
7,0	3,8	84,4	1,25	83,3
6,6	3,9	86,7	1,20	80,0
6,2	4,0	88,8	1,30	86,7
5,8	3,2	71,1	1,45	96,7
5,4	3,7	82,2	1,85	123,3
5,0	3,7	82,2	1,20	80,0

Tabelle 3: Wiederfindung eingewogenen C-Peptids in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Ergebnisse lassen keinen Schluß auf systematische pH-Wert-abhängige Beeinflussungen des RIA zu; die ab pH 5,8 divergierenden Werte im Sinne deutlich verringerter bzw. stark erhöhter Wiederfindung weisen jedoch auf unsystematische und im Einzelfall nicht vorhersehbare pH-Abhängigkeiten hin. Als Konsequenz aus diesem Ergebnis wurden alle Harnproben dieser Arbeit mit Phosphatpuffer pH 7,4 versetzt.

6.1.2. Einfluß verschiedener Harnstoffkonzentrationen

In Phosphatpufferlösung, pH 7,4, 0,5 % Humanalbumin, wurde Harnstoff in steigenden Konzentrationen eingewogen. Dabei wurden die physiologischen unteren und oberen Grenzwerte der Harnstoffkonzentration im Harn berücksichtigt. Dann wurde synthetisches C-Peptid in 2 verschiedenen Konzentrationen eingewogen und die Wiederfindungsrate im RIA bestimmt.

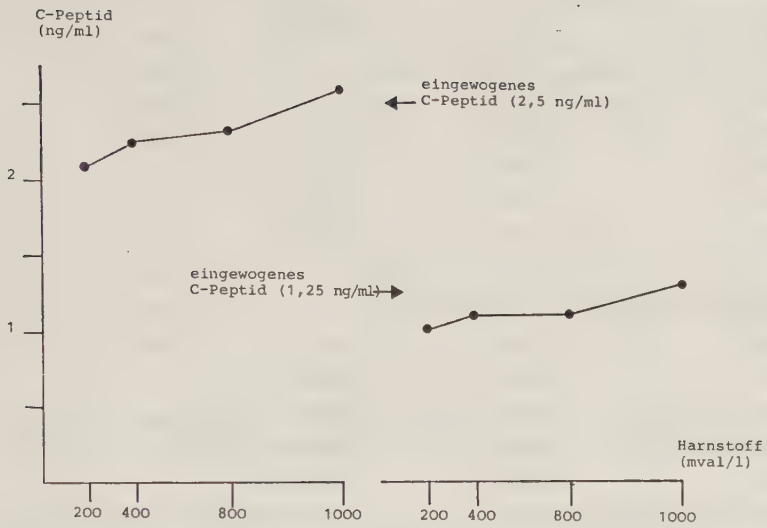

Abb. 7: Wiederfindung eingewogenen C-Peptids bei variabler Harnstoff-Konzentration des Mediums

Die Ergebnisse zeigen eine bei höheren und niedrigeren Konzentrationen gleichartig ansteigende Wiederfindungsrate des C-Peptids mit steigender Harnstoffkonzentration des Mediums, jedoch liegen alle Resultate im Bereich der für Radioimmunoassays als gut anzusehenden Wiederfindung über 80 % (siehe Tabelle 11 im Anhang). Der Unterschied zwischen 200 mval Harnstoff/l und 800 mval Harnstoff/l ist signifikant.

6.1.3. Einfluß variabler Osmolarität

2 verschiedene C-Peptidkonzentrationen wurden in Phosphatpuffer-Lösung (pH 7,4, 0,5 % Humanalbumin) eingewogen. Die Osmolarität der Lösungen wurde mit Glucose eingestellt, wobei die physiologischen Osmolaritätsschwankungen des Harns berücksichtigt wurden.

a. Eingewogenes C-Peptid: 1,66 ng/ml

Osmolarität (mosmol/l)	CPR (ng/ml)	Wdfdg. (%)
100	1,42	85,4
200	1,59	95,8
400	1,58	95,2
800	1,63	98,2
1200	1,49	89,8

b. Eingewogenes C-Peptid: 1,00 ng/ml

100	0,94	94,0
200	0,89	89,0
400	0,99	99,0
800	0,91	91,0
1200	0,91	91,0

Tabelle 4 a und b: Wiederfindung eingewogenen C-Peptids in Phosphatpufferlösung pH 7,4 mit 0,5 g/dl Humanalbumin in Abhängigkeit von der Osmolarität.

Alle Wiederfindungen liegen in einem als sehr gut zu bezeichnenden Bereich zwischen 85,4 und 98,2 bei höheren und 89,0 und 99,0 % bei niedrigeren Konzentrationen. Die beste Wiederfindung liegt im Bereich von 400 - 800 mosmol/l, in dem sich auch physiologischerweise die Harnosmolarität bewegt.

6.1.4. Einfluß variabler NaCl-Konzentrationen

2 verschiedene C-Peptidkonzentrationen (a: 5 ng/ml und b: 2,5 ng/ml) in Phosphatpuffer pH 7,4 mit 0,5 g/dl Humanalbumin wurden bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen gemessen, wobei die physiologischen Grenzen der NaCl-Konzentration im Harn berücksichtigt wurden.

	NaCl (mval/l)	CPR (5,0 ng/ml)	Wdfdg. (%)
a)	100	4,18	83,6
	200	4,63	92,6
	500	4,30	86,0
	1000	5,02	100,4
		(2,5 ng/ml)	
b)	100	2,06	82,4
	200	2,26	90,4
	500	2,33	93,2
	1000	2,62	104,8

Tabelle 5: Abhängigkeit der Wiederfindung eingewogenen C-Peptids von der NaCl-Konzentration des Mediums.

Alle Wiederfindungsmessungen liegen in einem gut reproduzierbaren Bereich zwischen 82,4 und 104,8 % der eingewogenen Menge. Es ist eine geringe Verbesserung der Wiederfindung bei höheren NaCl-Konzentrationen abzulesen, die jedoch konkordant für höhere und niedrigere C-Peptidkonzentrationen erst bei 100 mval/l ausfällt. Statistisch signifikante Unterschiede finden sich bei beiden Konzentrationen eingewogenen C-Peptids nur zwischen jeweils 100 mval/l und 1000 mval/l.

1.6.5. Einfluß verschiedener Albuminkonzentrationen

Bei verschiedenen Albuminkonzentrationen (3,5 % - 0,0 % Humanalbumin, Behringwerke, Marburg) wurde eingewogenes C-Peptid im RIA bestimmt. Es wurden 2 verschiedene Konzentrationen (2,5 ng/ml und 1,5 ng/ml) eingesetzt. Als Lösungsmedium diente Phosphatpufferlösung,pH 7,4.

Zusätzlich wurden Wiederfindungsversuche im Harn totalpankreatektomierter Patienten vorgenommen, die weder im Serum noch im Harn radioimmunologisch nachweisbares C-Peptid hatten. Die Konzentrationen des C-Peptides betrugen 5,0 ng/ml und 2,5 ng/ml.

a) Phosphatpuffer:

Albumin (g/dl)	C-Peptid (ng/ml)	% Wdfg.	C-Peptid (ng/ml)	% Wdfg.
0,0	2,0	80,0	1,15	92,0
0,1	2,06	82,4	1,06	84,8
0,5	2,25	90,0	1,28	102,4
3,5	2,58	103,2	1,25	100,0

b) Pankreatektomierten-Harn:

Albumin (g/dl)	C-Peptid (ng/ml)	% Wdfg.	C-Peptid (ng/ml)	% Wdfg.
0,0	4,17	83,4	2,21	88,4
0,1	4,93	98,6	2,23	89,2
0,5	4,48	89,6	2,28	91,2
3,5	4,28	85,6	2,30	92,0

Tabelle 6a und b: Abhängigkeit der Wiederfindung eingewogenen C-Peptids von der Albuminkonzentration des Mediums,
a) in Phosphatpuffer, pH 7,4
b) in Harn totalpankreatektomierter Patienten, pH 7,4

Übereinstimmende, statistisch signifikante Unterschiede der Wiederfindung für beide Konzentrationen eingewogenen C-Peptids lassen sich weder im Phosphatpuffer, pH 7,4, noch im Harn totalpankreatektomierter Patienten (mit nicht mehr nachweisbarem C-Peptid im Nativ-Serum und Nativ-Harn) nachweisen. Es ist deshalb der Schluß berechtigt, daß Albuminzusatz zum Assay zu keiner signifikanten Verbesserung der Wiederfindung führt.

6.2. Zuverlässigkeitstestung des C-Peptid-RIA im Harn

Die Zuverlässigkeit eines RIA wird - wie diejenige jeder anderen Labormethode zur Analyse von Blut oder Urin - vor allem über 2 Untersuchungen definiert: erstens, sog. Wiederfindungsversuche, bei denen eine definierte Menge der zu bestimmenden Substanz

in einer bestimmten Lösung in möglichst unterschiedlichen Konzentrationen eingewogen wird. Das Meßergebnis ist im Idealfall mit der errechneten Konzentration identisch. Zur Minimierung von Streuungsfehlern sollten möglichst - wie auch in der vorliegenden Arbeit bei allen methodischen Untersuchungen geschehen - Mehrfachbestimmungen vorgenommen werden(hier: 6fach-Bestimmungen). Als zweites Kriterium dienen Verdünnungsreihen, bei denen die zu analysierende Körperflüssigkeit in arithmetischer oder geometrischer Reihe verdünnt wird. Das Resultat der Messung soll - multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor - möglichst identisch mit dem Ergebnis der unverdünnten Probe sein. Es ist jedoch ein bei Radioimmunoassays häufig zu beobachtendes Phänomen, mit steigender Verdünnung merklich ansteigende Resultate zu liefern (CRESTO und YALOW 1974) und später dann linear zu verlaufen, der sogenannte "hook-effect".

Die Wiederfindungsversuche werden möglichst so ausgeführt, daß man Serum bzw. Plasma oder Urin eines Probanden verwendet, dem das Organ der Synthese des zu bestimmenden Peptids entfernt wurde, so daß im RIA die betreffende Substanz nicht mehr nachweisbar ist. Für Insulin und C-Peptid bietet sich das Modell des totalpankreatektomierten Menschen an, in dessen Serum (Plasma) und Harn bei vollständiger chirurgischer Entfernung des Pankreas kein endogenes Insulin und C-Peptid nachweisbar sind.

6.2.1. Wiederfindungsversuche

Die Wiederfindungsversuche sind schon im Zusammenhang mit der Albuminabhängigkeit der Wiederfindung im Pankreatektomierten-Harn abgehandelt worden, wobei die Resultate von 83,4 % - 102,6 % wiedergefundenen C-Peptids sehr zufriedenstellende Werte sind.

6.2.2. Verdünnungsreihen

Es wurden mehrere Verdünnungsreihen mit Harn bekannter Konzentration durchgeführt, wobei einerseits geometrische Verdünnungen mit hoher Endverdünnung von bis zu 1 : 32 stattfanden, anderer-

seits Verdünnungen mit einer Abstufung von 1 : 1,5 - 1 : 4. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 im Anhang aufgeführt.

Die Verdünnungen des Harns zeigen in allen Fällen mit höherem Verdünnungsfaktor ansteigende Werte, die sich jedoch im Rahmen des von anderen Radioimmunoassays her bekannten Anstiegs halten.

Zusätzlich wurde zur Kontrolle eine Standardkurve in Pankreatektomierten-Harn erstellt, die, wie Abb. 8 zeigt, weitgehend parallel zur normalen Standardkurve in Phosphatpuffer verläuft. Für beide Standardkurven wurden Reagenzien derselben Charge verwendet.

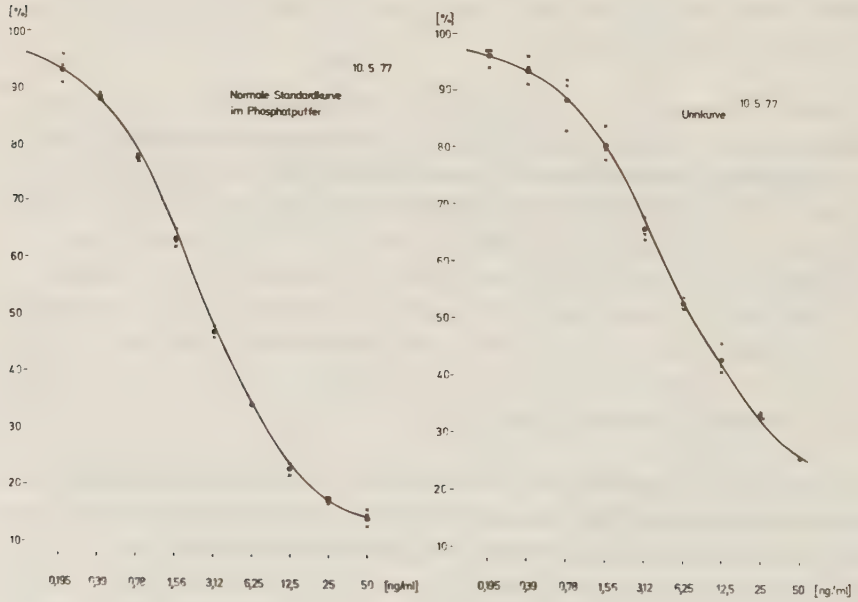

Abb. 8: Standardkurven des C-Peptid-RIA in
a) Phosphatpuffer, pH 7,4 und
b) Harn totalpankreatektomierter Patienten

6.2.3. Inter- und Intraassayvarianz der verwendeten Radioimmunoassays

Unter Interassayvarianz versteht man die bei gezielter Bestimmung einer Probe mit Reagenzien verschiedener Chargen auftretenden Abweichungen, ausgedrückt als Variationskoeffizient, also relative Standardabweichung vom Mittelwert. Als Intraassayvarianz bezeichnet man die mehrfach mit Reagenzien einer einzigen Charge gemessenen Proben.
Die Inter- und Intraassayvarianz der verwendeten RIAs sind in der Tabelle 7 dargestellt. Der Insulin-RIA wird im Diabetes Forschungsinstitut an der Universität Düsseldorf routinemäßig eingesetzt, wobei beide Werte bei laufenden Kontrollen unter 10 % liegen.

	Interassayvarianz (%)	Intraassayvarianz (%)
C-Peptid-RIA (Serum)	12,7	4,2
C-Peptid-RIA (Urin)	14,6	3,8
Insulin-RIA (Serum)	< 10	< 10

Tabelle 7: Inter- und Intraassayvarianz der benutzten RIAs

7. ERGEBNISSE DER KLINISCHEN UNTERSUCHUNGEN

7.1. Verhalten von CPR und IRI im Serum

7.1.1. Tagesverlauf von CPR und IRI im Serum

Die Konzentrationen des CPR und IRI i.S. der drei untersuchten Gruppen sind detailliert in Tabelle 13/14 im Anhang dargestellt, außerdem graphisch in der Abb. 9. Dabei fällt ein deutlicher Hyperinsulinismus mit ebenfalls korrespondierend hohen CPR-Werten bei den ED auf. Die ID zeigen entsprechend dem bekannten Insulinmangel deutlich subnormale CPR-Werte. Die Serumspiegel von ED und KO bzw. ID und KO unterscheiden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant, ebenso die Flächen unter den Kurven des CPR und IRI i.S.

Die drei Gruppen verhalten sich formal erstaunlich konform mit deutlichem Anstieg des CPR bis 10.00 h und nochmaligem, wenn auch geringerem Anstieg bis 14.00 h, wie aus Abb. 9 zu ersehen (in dieser Abbildung sind CPR- und IRI-Konzentrationen i.S. in pmol/l umgerechnet, um die molaren Verhältnisse zu illustrieren).

Hier wird auch der relativ stärkere Anstieg des IRI gegenüber dem CPR evident. Andererseits sind aus dem 5mal größeren Maßstab für Insulin (auf der Ordinate rechts im Bild aufgetragen) die beträchtlich niedrigeren Insulinkonzentrationen im Serum abzulesen.

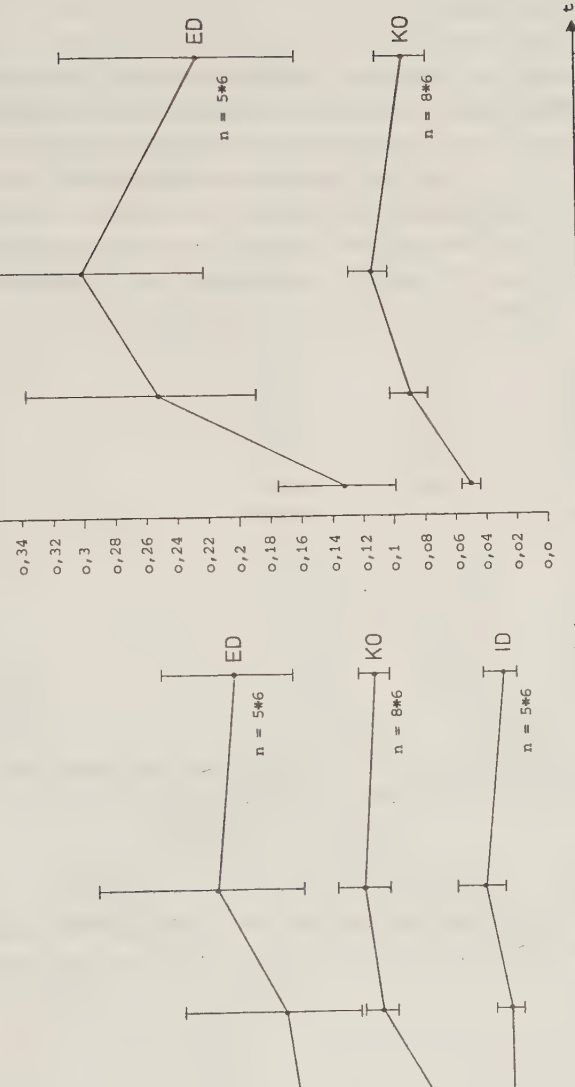

Abb. 9: Tagesverlauf von CPR und IRI im Serum ($\bar{x} \pm SEM$)

7.1.2. Anstieg der Serumkonzentration von CPR und IRI unter Stimulation

Um das relative Maß des alimentär (und bei den ED auch Sulfonylharnstoff) induzierten Anstiegs der CPR- und IRI-Konzentration zu bestimmen, wurde jeweils der Quotient zwischen dem 10.00, 14.00 und 21.00-h-Wert und dem Nüchternwert berechnet. Wie aus den in Tabelle 8 zusammengefaßten Zahlen ersichtlich, weisen die ED den geringsten Anstieg des Serum-CPR in Relation zum Basalwert auf. Erstaunlicherweise übersteigt die relative Stimulierbarkeit des CPR i.S. der ID noch diejenige der KO.

CPR	10.00	14.00	21.00	h
KO	1,48	1,63	1,54	
ED	1,05	1,33	1,26	
ID	1,04	1,73	1,25	
IRI	**10.00**	**14.00**	**21.00**	**h**
KO	1,79	2,31	1,86	
ED	1,91	2,27	1,71	

Tabelle 8: Relativer Anstieg des CPR und IRI im Serum zum Nüchternwert ($CPR_{aktuell}$ /CPR_{basal} und $IRI_{aktuell}$ /IRI_{basal})

Bei den IRI-Werten ergaben sich etwas größere Quotienten, die mit dem relativ stärkeren Anstieg des IRI i.S. erklärt werden können. Die Unterschiede zwischen den KO und ED waren jedoch nur unwesentlich.

7.1.3. CPR/IRI-Quotient

Wie schon unter 7.1.1. erwähnt und auch in Abb. 9 zu sehen, übersteigen die molaren Konzentrationen des CPR i.S. diejenigen des IRI beträchtlich. Die Ursache ist - wie bereits angeführt -

die längere HWZ des C-Peptids. Quantifizieren läßt sich dies durch den CPR/IRI-Quotienten. Dieser fällt unter Stimulation ab, da der relative Anstieg der Serum-Konzentrationen des IRI größer ist als beim CPR. Dementsprechend steigt mit fallendem CPR-Spiegel bei gleichzeitig stärkerem Abfall des IRI-Spiegels der CPR/IRI-Quotient wieder (siehe Abb. 10).

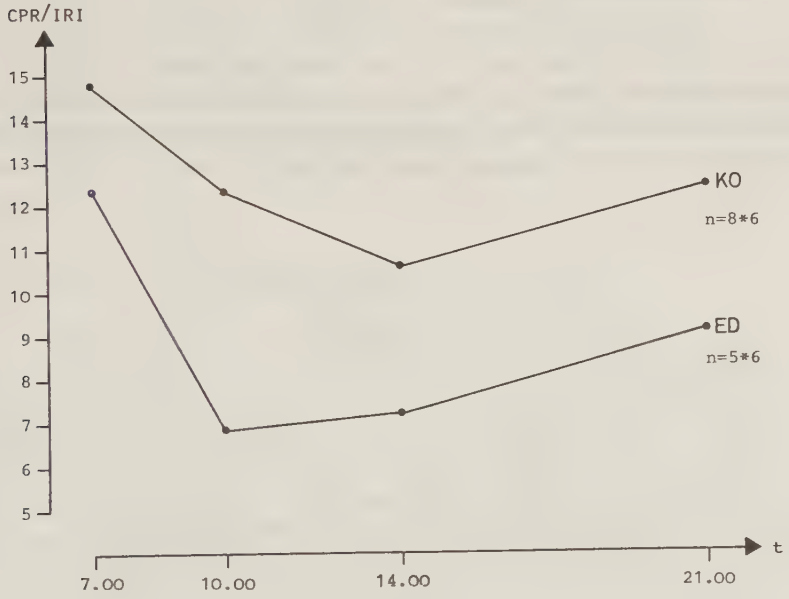

Abb.10: CPR/IRI-Quotient im Serum

7.1.4. Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der Messungen von CPR und IRI im Serum

Ein wichtiger Aspekt für die Beurteilung eines klinischen Parameters ist die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses, nicht nur im methodischen, sondern auch im physiologisch-pathophysiologischen Bereich, d.h. eine beim selben Patienten unter vergleichbaren Ausgangsbedingungen wiederholte Untersuchung soll annähernd das gleiche Resultat ergeben.

Deshalb wurde der durchschnittliche intraindividuelle Variationskoeffizient (iVK) des CPR und IRI i.S. errechnet und miteinander verglichen. Dabei stellen sich erhebliche Unterschiede zwischen CPR und IRI heraus (Abb. 11).

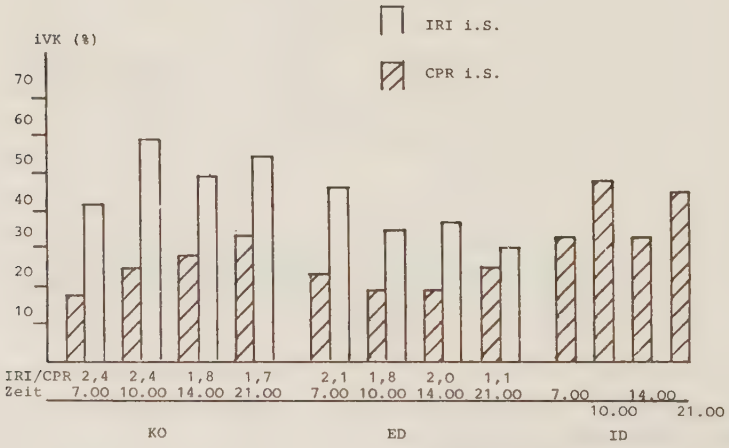

Abb. 11: Durchschnittlicher iVK von CPR und IRI im Serum.

Während bei den KO der iVK des CPR zwischen 17 und 31,8 % liegt, bewegt er sich beim IRI zwischen 40,6 und 52,9 %.

Bei den ED beträgt der iVK für CPR 17,7 - 25, 3 % und für das IRI 33,6 - 45, 1 %.

Bei den ID schwankt der iVK des CPR zwischen 31,8 und 46,9 %. Der durchschnittliche iVK der Flächen unter CPR bzw. IRI i.S. betrug für die KO: 18,1 bzw. 32.8 %, für die ED: 12,6 bzw. 22,4 % und für die ID: 26,7 %.

Im Mittel aller Untersuchungszeiten liegt der iVK des IRI bei den KO 2,1-und bei den ED 1,75mal so hoch wie für das CPR.

Das C-Peptid ist also bei einem Untersuchungsraster wie in dieser Arbeit der hinsichtlich Reproduzierbarkeit zuverlässigere Parameter für die Beurteilung des Stimulationszustandes des B-Zellsystems.

7.1.5. Korrelation von CPR und IRI im Serum

Da das C-Peptid und das Insulin molar äquivalente Sekretionsprodukte sind, stellt sich die Frage, ob sie nichtnur unter den Bedingungen kurzzeitiger Stimulation mit Sulfonylharnstoffen oder Glucose in ihren Serumkinetiken miteinander korrelieren (KANEKO et al. 1975 und GRÜNEKLEE et al. 1976), sondern ob auch unter Bedingungen langfristiger und physiologischer, alimentär bedingter Stimulation der Insulin- und C-Peptidsekretion noch bei gröberem Untersuchungsraster eine Korrelation nachweisbar ist.

Deshalb wurden für die einzelnen Untersuchungszeitpunkte Korrelationen zwischen den gemessenen C-Peptid- und Insulinkonzentrationen im Serum sowie zwischen den Flächen unter den betreffenden Kurven aufgestellt.

Die Korrelationen wurden als verteilungsunabhängige Spearman'sche Korrelation durchgeführt. Die errechneten Korrelationskoeffizienten sind in der Tabelle 9 aufgeführt und alle auf dem 1 %-Niveau signifikant.

Korrelation	r	Signifikanz	n
CPR/IRI 7.00	0,62	$p < 0,01$	78
CPR/IRI 10.00	0,55	$p < 0,01$	78
CPR/IRI 14.00	0,70	$p < 0,01$	78
CPR/IRI 21.00	0,62	$p < 0,01$	78
Fläche CPR/ Fläche IRI	0,69	$p < 0,01$	78

Tabelle 9: Korrelation zwischen CPR und IRI i.S. an den einzelnnen Untersuchungszeitpunkten sowie der Flächen unter den Kurven (für das Kollektiv KO und ED)

Erwähnenswert ist die eindeutig bessere Korrelation der Flächen unter den Serumkurven von IRI und CPR als die der jeweiligen Einzelwerte. Hier machen sich vor allem die Oszillationen des Insulins bemerkbar, die zu einer weniger zuverlässigen Reproduzierbarkeit und damit auch zu Verschlechterungen der Korrelationen zum C-Peptid führt.

Dieser Nachteil wird durch die Verwendung der Flächen unter den Kurven z.T. ausgeglichen, so daß man bei der Verwendung von Serumbestimmungen des Insulins bzw. des C-Peptids zur Beurteilung des Funktionszustandes der B-Zellen nicht nur dem kinetischen Aspekt von Anstieg und Abfall sowie der absoluten Höhe des Anstiegs Beachtung schenken sollte, sondern vor allem auch dem integralen Parameter der Flächen unter den Kurven.

7.2. C-Peptid-Ausscheidung im Harn

7.2.1. Tagesausscheidung von CPR

Die tägliche Ausscheidung des C-Peptids im Harn betrug als Summe der täglichen 4 Sammelfraktionen für KO: 44,2 µg, ED: 54,0 µg und ID: 11,5 µg. Die Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen waren wie bei den Serumwerten statistisch signifikant.

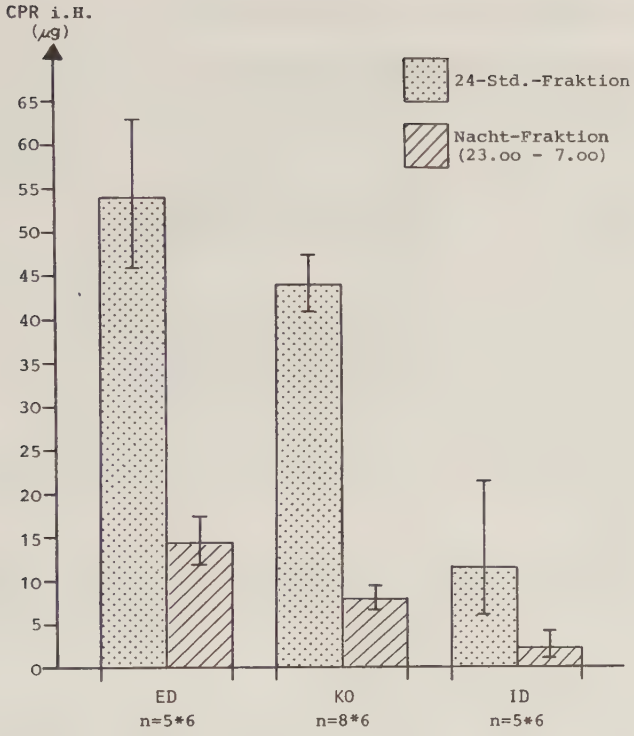

Abb. 12: CPR-Ausscheidung im Harn über 24 Std sowie zwischen 23.00 und 7.00 h

Aus der Höhe der nächtlichen CPR-Ausscheidung in der Sammelfraktion IV läßt sich bei den ED ablesen, daß die Ausscheidung unter Basalbedingungen bei ihnen einen beträchtlichen Anteil am gesamten Harn-CPR ausmacht.

7.2.2. CPR-Harnausscheidung in Einzelfraktionen

Bei der Betrachtung der CPR-Harnausscheidung in den Einzelfraktionen fällt bei den KO eine ausgeprägte Tagesrhythmik mit Maximum der Ausscheidung in der Fraktion II (13.00 - 19.00 h) auf, die man bei den ED vermißt. Hier zeigt sich im Gegensatz eine kontinuierlich über Tag ansteigende Ausscheidung, wobei die graphische Aussage der Abb. 13 a noch dahingehend zu ergänzen ist, daß die Fraktion III (19.00 - 23.00 h) nur 4 Std. lang ist und nicht 6 Std. wie die Fraktionen I und II, so daß die höchste CPR-Exkretion/Std. bei den ED in den Fraktionen III und IV erreicht wird, was weiterhin auch durch die Abb. 13 b illustriert wird, in der jeweils die Fraktionen I und II sowie III und IV zusammengefaßt sind: hier zeigt sich noch deutlicher, daß die Ausscheidung in der zweiten Tageshälfte bei den ED deutlicher höher liegt als in der ersten. Es besteht also bei den ED eine prolongierte Ausscheidung des CPR im Harn, die zu einer gegenüber der Kontrollgruppe fast doppelt so hohen nächtlichen Ausscheidung führt und damit einen deutlich erhöhten Anteil an der gesamten Tagesexkretion des CPR im Harn repräsentiert, nämlich 26,7 % gegenüber 18 % bei den KO.
Die Verhältnisse bei den ID liegen ganz anders: hier zeigt sich eine deutliche Tagesrhythmik mit Maximum der Ausscheidung in der Fraktion II (13.00 - 19.00 h) und deutlichem Abfall in der Nacht. Dies geschieht in Analogie zu den CPR-Spiegeln im Serum und weist auch hier auf eine durchaus noch erhaltene, adaptative Mehrsekretion des CPR unter Stimulation hin. Der Anteil der nächtlichen Exkretion lag mit 19,5 % des 24-Std-Wertes nur geringfügig höher als bei den KO.

7.2.3. Basalausscheidung und stündliche C-Peptidausscheidung im Harn

Ausgehend von den Werten der nächtlichen CPR-Ausscheidung wurde die stündliche CPR-Ausscheidung für die Fraktion IV (20.00 - 7.00 h) errechnet und mit der durchschnittlichen stündlichen Ausscheidung über Tag - errechnet aus der Summe der Fraktionen I,

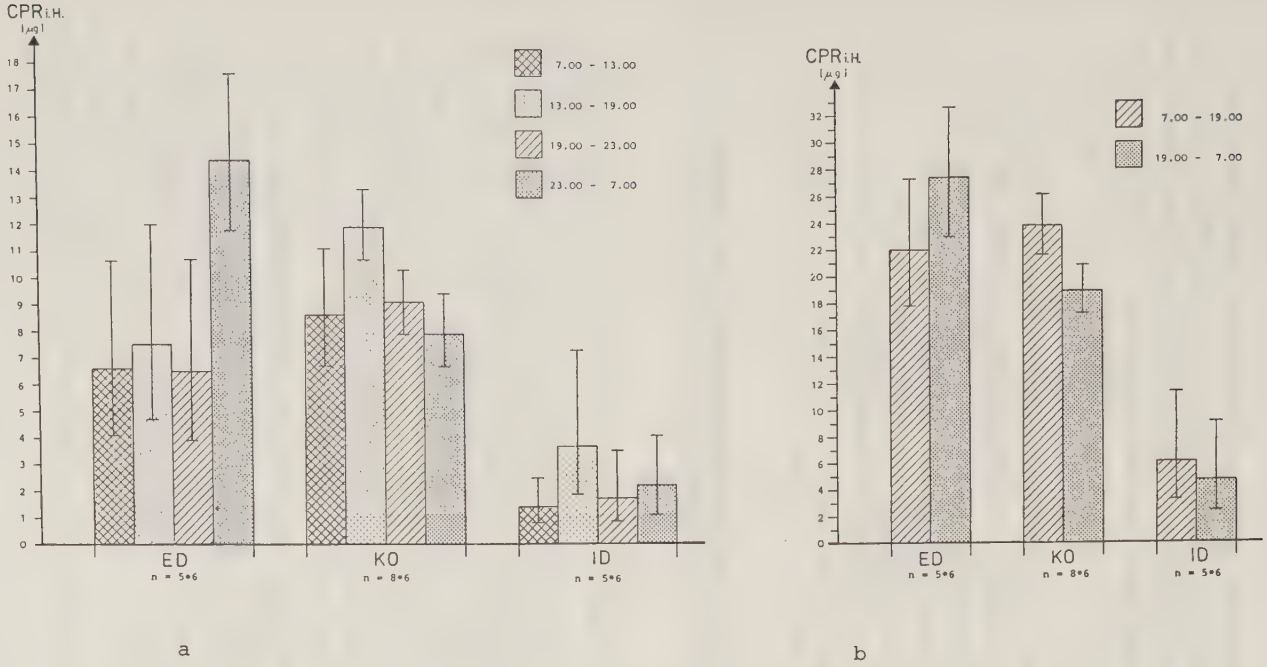

Abb. 13 a und b: Ausscheidung des CPR i.H., getrennt a) nach Einzelfraktionen und Untersuchungskollektiven und b) nach Tages- und Nachtausscheidung

II und III, d.h. 7.00 - 23.00 h - verglichen. Die die nächtliche Basalausscheidung dabei übersteigenden Werte sind als Maß der physiologischerweise durch Nahrungsaufnahme induzierten C-Peptidsekretion aufzufassen. Die durchschnittliche stündliche C-Peptidausscheidung über Tag belief sich bei den KO auf 227 %, bei den ED auf 137 % und bei den ID sogar auf 257 % der Basalausscheidung.
Es zeigt sich hier ein Bild analog zu den Serumverläufen: einer hohen Basalausscheidung steht bei den ED eine nur noch sehr begrenzte Sekretionsreserve gegenüber, wie sie sich auch durch den nur noch geringen Anstieg der Serum-CPR-Konzentration bei stark erhöhten Nüchternwerten des CPR i.S. manifestierte.
Auch hier wieder die größte relative Zunahme bei den ID, deren prozentuale Sekretionsreserve noch diejenige der KO übertraf und somit die im Serum gefundenen Zusammenhänge bestätigt.

7.2.4. Intraindividuelle Reproduzierbarkeit als Maß der biologischen Variabilität der C-Peptidausscheidung im Harn

Um die Reproduzierbarkeit der C-Peptidausscheidung im Harn und damit auch die Aussagezuverlässigkeit der Harn-C-Peptid-Bestimmung zu prüfen, wurde der iVK der C-Peptidausscheidung über die 6 Untersuchungstage bestimmt. Der iVK des CPR i.H. beträgt für die KO: 20,1 %, die ED: 19,2 % und die ID: 33,1 %.
Die Abb. 14 zeigt eine Zusammenstellung der verschiedenen iVK für die Flächen unter den Kurven des CPR und IRI i.S. sowie der Harnausscheidung des CPR.
Dabei zeigt sich, daß auch die Fläche unter der Insulinkurve im Serum dem korrespondierenden Wert der C-Peptidkurve i.S. in der Reproduzierbarkeit deutlich unterlegen ist, wohingegen dieser sich in fast der gleichen Größenordnung bewegt wie die Variationskoeffizienten im Harn und nur bei den ED noch auffällig besser darstellt.

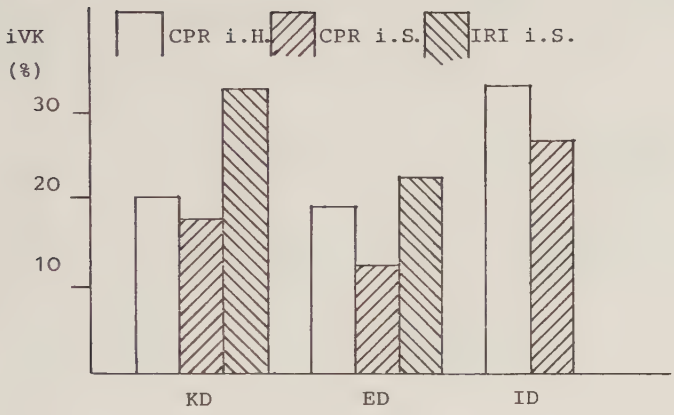

Abb. 14: Durchschnittlicher intraindividueller Variationskoeffizient (iVK) der Flächen unter CPR und IRI im Serum sowie des CPR im Harn

7.2.5. Korrelation zwischen Serum-CPR und Harn-CPR

Nachdem das zeitlich parallele Verhalten von C-Peptid im Serum und C-Peptid im Harn beschrieben worden ist, stellt sich die Frage, inwiefern die im Harn gemessene C-Peptidmenge repräsentativ für die zeitlich zugehörigen Serum-C-Peptidspiegel ist. Da die Ausscheidung im Harn einen kumulativen Parameter über den ganzen Tag darstellt, ist er mit einem punktuell gemessenen C-Peptidwert im Serum nicht vergleichbar.

Deshalb wurde auch hier wiederum die Fläche unter der Kurve des C-Peptids im Serum gewählt. Diese beiden Parameter wurden miteinander korreliert. Die Korrelation wurde als verteilungsunabhängige Spearman'sche Korrelation berechnet, ist also unabhängig von einer evtl. fehlenden Normalverteilung innerhalb des Untersuchungskollektivs.
Abb. 15 zeigt als Punktwolke und Regressionsgerade die Korrelation mit einem r = 0,83.

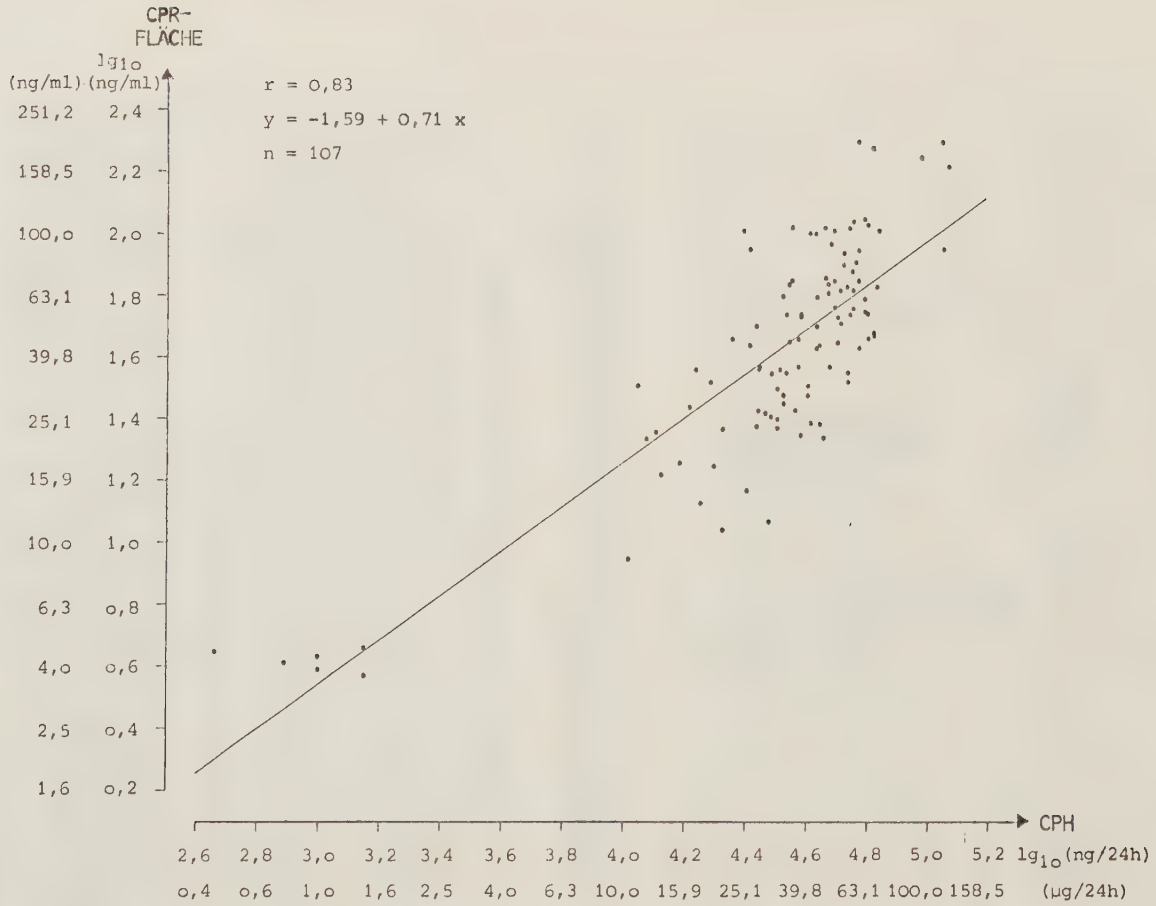

Abb. 15: Korrelation zwischen der Fläche unter der Kurve des C-Peptid i.S. und der C-Peptid-ausscheidung im Harn / 24 St. Kollektiv: KO + ED + ID

Diese Korrelation ist statistisch signifikant ($p < 0,01$), das im Harn ausgeschiedene C-Peptid ist also repräsentativ für den jeweiligen Level des C-Peptids im Serum.

8. DISKUSSION

8.1. Untersuchungsablauf und Personen

Die Untersuchung sollte innerhalb eines Intervalls von maximal 3 Wochen beim einzelnen Probanden abgeschlossen sein, wurde jedoch de facto innerhalb von 6 - 15 Tagen absolviert, so daß eine Stoffwechselkontrolle von 40 - 100% des eingeschlossenen Zeitintervalls resultierte. Dies erscheint für eine zuverlässige Aussage über die biologische Variabilität der gemessenen Parameter ausreichend und verringerte die Gefahr, daß ein Patient wegen störender Einflüsse auf die B-Zell-Funktion, z.B. wegen Infekten o.ä., aus dem Untersuchungsprogramm ausgeschlossen werden mußte.

Die Wahl der Zeitpunkte der Blutentnahmen stellen einen Kompromiß zwischen dem organisatorisch Möglichen und dem von der Fragestellung her Wünschenswerten dar: für eine optimale Kontrolle des Serum-C-Peptids und -Insulins wären vielfache Blutentnahmen in kurzen Intervallen erstrebenswert gewesen, die auch den Ablauf von Stimulation und Rückkehr der Serumkonzentrationen beider Peptide zu Basalbedingungen unter der postprandialen Resorption gezeigt hätten; bei einem ausreichend engmaschigen Raster wäre es sogar möglich gewesen, mit hoher Sicherheit die Maxima zu erfassen. Es mußte jedoch auf das für die betroffenen Patienten zumutbare Maß an Belastung durch die multiplen Venenpunktionen begrenzt werden.

Deshalb wurde zusätzlich zum Nüchternwert um 10.00 und 14.00 h postprandial Blut entnommen. Der Abstand zu den üblichen Hauptmahlzeiten wurde so gewählt, daß die Serumwerte möglichst im Bereich maximaler Stimulation lagen. Verschiebungen und Einflüsse sind jedoch möglich, vor allem durch wechselnde Resorptionsverhältnisse infolge höheren und niedrigeren Ballaststoffanteils der Nahrung wie auch durch körperliche Ruhe oder Bewegung.

Den stärksten Einflüssen dürfte wohl der 21.00 h-Wert unterliegen, da durch variable Spätmahlzeiten einzelner Patienten eine

zusätzliche Stimulation der Insulin- und C-Peptidsekretion anzunehmen ist.

In gleicher Weise wie bei den Blutentnahmen wären auch für das Sammeln des 24-Std-Harns möglichst viele Proben in kurzen Intervallen erwünscht gewesen. Doch gerade das Harnsammeln ist in hohem Maß von der Kooperation des Patienten abhängig. In diesem Fall war vor allem die zuverlässige Blasenentleerung zum Ende einer Sammelperiode notwendig, um nicht die Ausscheidung in der nächsten Periode verfälschend zu belasten. Allzuviele Sammelfraktionen über den Tag hätten durch Belästigung und Überforderung möglicherweise unzuverlässiges Sammeln provoziert und trotz großer Probenzahlen und kleiner Intervalle nur zu einer Pseudopräzision geführt. Da eine Aufteilung der nächtlichen Harnausscheidung in 2 Sammelfraktionen besonders störend gewirkt hätte, wurde von 23.00 - 7.00 h durchgehend in einer Fraktion gesammelt. Als individueller Störfaktor hätte auch Restharnbildung gewirkt, hierfür gab es jedoch keinen klinischen Anhalt.

Die Altersverteilung ist vor allem zwischen den Kollektiven der Erwachsenendiabetiker und insulinbedürftigen Diabetiker sehr unterschiedlich, dies repräsentiert vor allem das unterschiedliche Manifestationsalter der verschiedenen Typen des Diabetes mellitus. Es finden sich jedoch in der Literatur keine Hinweise auf altersspezifische Veränderungen des Insulin- und C-Peptidstoffwechsels bzw. der renalen Degradation und Ausscheidung des C-Peptids. Insofern sind systematische Fehler nicht wahrscheinlich.

8.2. Diskussion der methodischen Untersuchungen

Bei der Weiterverarbeitung des gewonnenen Blutes wurde darauf geachtet, daß unmittelbar nach dem Abzentrifugieren die Seren bei -20°C tiefgefroren wurden. Da zusätzlich alle Bestimmungen spätestens nach 6wöchiger Lagerung durchgeführt wurden, besteht

kaum die Möglichkeit von Verlusten. Auch FABER et al. (1978) fanden bei Temperaturen von -25°C kaum noch Lagerungsverluste des C-Peptids im Plasma, während höhere Temperaturen durchaus die gemessenen C-Peptidkonzentrationen verringern können.

Der Harn für die C-Peptidbestimmungen wurde nach Ende einer Sammelperiode zentrifugiert und danach ebenfalls sofort bei -20°C tiefgefroren. Während der Sammelperioden fand die Aufbewahrung bei +4°C statt. Diese Lagerung wirft keine Probleme auf, da nach KUZUYA et al. (1976) die C-Peptidkonzentrationen bei dieser Temperatur über 2 Tage nicht beeinflußt werden.
Bei probatorischen Messungen mit aufgelöstem Harnsediment fand sich keine C-Peptid-Aktivität im RIA, so daß auch diese Möglichkeit einer Konzentrationsbeeinflussung durch die Handhabung ausgeschlossen ist.

Ein wichtige Frage ist die Spezifität der verwandten RIAs: sowohl beim C-Peptid-RIA wie beim Insulin-RIA kommen Kreuzreaktionen mit humanem Proinsulin vor. Diese spielen beim Insulin wegen der höheren Proinsulinkreuzreaktivität im Insulinassay eine gewisse Rolle, vor allem unter Basalbedingungen. Unter Stimulation, mit abnehmendem Proinsulinanteil am totalen IRI, verringert sich ihre quantitative Bedeutung. Bei einer Kreuzreaktivität des Proinsulins von etwa 66 %, wie sie HEDING (1977) fand, bedeutet dies einen Anteil von 13 % Proinsulin am totalen IRI bei einem molaren Anteil von ca. 20 %.

Im Vergleich dazu gestaltet sich die Situation beim C-Peptid wesentlich günstiger: bei einem Proinsulinanteil von 20 % am totalen IRI steht dieses unter Basalbedingungen in einer Relation von 1 : 14,8 (KO) bzw. 1 : 12,4 (ED) zum CPR, d.h. der Proinsulinanteil am totalen CPR beläuft sich auf 1,4 % (KO) bzw. 1,6 % (ED). Da zudem die Immunreaktivität des Proinsulins im CPR-RIA nur ca. 10 % beträgt (KANEKO et al. 1974), liegen die effektiven Fehlbestimmungen des CPR durch kreuzreagierendes Proinsulin weit unter 1 %.

Bei der methodischen Testung war das Verdünnungsverhalten im Harn auffällig: es fanden sich oft nicht ganz lineare Verdünnungskurven. Als Ursachen hierfür sind

1. spezifische Bedingungen des Milieus,
2. der sog. hook-effect (CRESTO und YALOW 1974),
3. oligomere C-Peptid-Aggregate und
4. C-Peptidfragmente mit erhaltener Immunreaktivität

zu diskutieren.

Die Erklärung durch spezifische Einflüsse des Harns bietet sich an, da die Verdünnungen des Serum-C-Peptids linear verlaufen. Ein gewichtiges Argument gegen diese Erklärung ist jedoch die fast völlige Übereinstimmung einer Verdünnungskurve eingewogenen synthetischen C-Peptids im Pankreatektomiertenharn mit einer normallen Kurve. Spezifische Harneinflüsse hätten sich hier bemerkbar machen müssen.

Der vor allem bei Antikörperüberschuß und nur bei divalenten Antikörpern (CRESTO und YALOW 1974) auftretende hook-Effekt, der mit der Bindungskooperativität bereits gebildeter Ag-Ak-Komplexe auf die Formation weiterer AgAk-Komplexe bzw. der Ausbildung nicht präzipitierender Aggregate aus mehreren AgAk-Komplexen erklärt wird, kommt auch nicht in Betracht, da der hook-Effekt nur bei niedrigen Antigen-Konzentrationen am Ende der Verdünnungskurve beobachtet wird, während unsere Kurven nur initial bei niedrigen Verdünnungen relative Anstiege der Konzentrationen zeigten, um dann linear abzufallen. Die Möglichkeit oligomerer C-Peptid-Aggregate ist auch nur mit Einschränkungen aufrechtzuerhalten, da sich diese Komplexe auch im Pankreatektomiertenharn hätten formieren müssen, es sei denn, man gibt sich damit zufrieden, einen protektiven Einfluß der 4 zusätzlichen Aminosäuren des synthetischen humanen C-Peptids auf die Bildung solcher Aggregate zu postulieren. Die Existenz solcher Aggregate, zumindest im Serum, ist jedoch nach Literaturangaben durchaus wahrscheinlich, denn KUZUYA et al. (1978a) fanden bei Gelfiltrationsstudien Substanzen vom 2 - 3fachen Molekulargewicht des C-Peptids, die im C-Peptid-RIA reagierten.

Die gleichen Autoren fanden jedoch sowohl bei Gesunden wie bei

Diabetikern mit höhermolekularer C-Peptid-reagierender Fraktion im Serum (Proinsulinbereich) ein sog. single-peak-Elutionsprofil im Harn, d.h. nur eine Fraktion, die im CPR-RIA reagierte.
Die höchste Wahrscheinlichkeit besitzt die Annahme von C-Peptid-Fragmenten mit erhaltener Immunreaktivität. Diese können entweder bereits intrapankreatisch, etwa als Produkt einer chymotrypischen Spaltung von Proinsulinintermediaten entstehen, wie sie TAGER et al. (1973) beobachtete, oder aber extrapankreatische Degradationsprodukte des C-Peptids sein. Hier ist vor allem eine renale C-Peptiddegradation, die zu immunreaktiven Fragmenten im Harn führt, vorstellbar. Diese können entweder unmittelbar postdegradativ im Harn erscheinen, etwa durch tubuläre Sekretion, oder aber auch nach Rezirkulation im Blut glomerulär filtriert werden. Hierfür sprechen Substanzen mit niedrigerem Molekulargewicht als C-Peptid, die KUZUYA et al. (1978a) im Serum fanden. Es ist jedoch zumindest fraglich, daß eine Proinsulinkreuzreaktivität wie im Serum im Harn vorkommt: das Molekulargewicht des Proinsulins liegt mit 9000 Dalton oberhalb der Grenze für frei filtrierbare Moleküle von ca. 5000 Dalton. In Verbindung mit den schon niedrigen Serumkonzentrationen und den im Vergleich zum Serum weit höheren Konzentrationen des CPR im Harn scheidet diese Möglichkeit weitgehend aus. Auch HORWITZ et al. (1977) weisen darauf hin, daß Proinsulin erst nach 100facher Anreicherung im Harn nachweisbar ist.

Die Untersuchung der möglichen Einflüsse des Harnmilieus auf die CPR-Bestimmung ergab eine erfreuliche Unempfindlichkeit gegenüber den im Harn stark variierenden Harnstoff- und NaCl-Konzentrationen sowie unterschiedlicher Osmolarität. Im sauren Milieu zeigten sich deutliche Veränderungen der Wiederfindung. Albuminzugabe besserte die Wiederfindung nur unerheblich, wie auch HEDING (1975a) berichtet, daß das C-Peptid keine Oberflächenadsorption zeigt wie das Insulin.

Die Interassayvarianz des C-Peptid-RIA betrug 12,7 % im Serum und 14,6 % im Harn.
Die Intraassayvarianz lag bei 4,2 % im Serum und 3,8 % im Harn.

Die relativ hohe Interassayvarianz sowohl im Serum wie im Harn ist wahrscheinlich durch Inhomogenität der Antikörperbindung des kommerziellen Antikörpers bedingt, da kommerzielle Antikörper im allgemeinen gepoolt sind und gewisse quantitative Abweichungen von Charge zu Charge zeigen. Die für einen RIA recht niedrig liegende Intraassayvarianz zeigt, daß keine labortechnischen Ursacheninfrage kommen, da diese sich hier auch auswirken müßten.

8.3. Diskussion der Ergebnisse der klinischen Untersuchungen

Die gemessenen Konzentrationen des CPR i.S. zeigen bei den KO im Tagesverlauf einen deutlichen Anstieg bis um 10.00 h mit einer nochmaligen geringen Steigerung bis 14.00 h auf 163 % des Basalwertes. Diese Werte können natürlich nur als approximativ hinweisend für das Niveau der C-Peptidwerte im Serum angesehen werden, da die postprandialen Maxima durchaus früher oder später als zum Blutentnahmezeitpunkt auftreten können. Auch wird sich wahrscheinlich zwischen 10.00 h und 14.00 h noch ein Minimum der Kurve finden, das als Ausdruck der nachlassenden Stimulation bei Beendigung bzw. Rückgang der intestinalen Resorption zu werten wäre, das jedoch aufgrund des groben Rasters der Beobachtung entgeht. Gleiches trifft natürlich auf die Zeit zwischen 14.00 h und 21.00 h zu. Andererseits können die gemessenen Werte als durchaus repräsentativ für die Höhe der erreichten C-Peptidspiegel angesehen werden, da unter den physiologischen Bedingungen postprandialer Resorption sich nur langsame und anhaltende Steigerungen der Serumkonzentrationen des CPR (und natürlich auch des IRI) finden, die nicht wie unter massiver Stimulation, wie z.B. mit Sulfonylharnstoffen, Tolbutamid i.v. oder auch mit oraler Glucosegabe, ein ausgesprochen kurzfristiges Maximum zeigen, dem ein steiler Konzentrationsabfall folgt. Erstaunlicherweise steigen die Serumkonzentrationen des CPR bei den ID in gleichem Muster an, wie bei den Kontrollen. Schon der Nüchternwert mit 0,75 ng/ml ist beträchtlich und weist darauf hin, daß der insulinbedürftige Diabetes keineswegs unter einem vollständigen Insulinmangel leidet, sondern daß in vielen Fällen durchaus noch nennenswerte Mengen an Insulin sezerniert werden können.

Darüberhinaus zeigt der Anstieg auf 1,30 ng/ml um 14.00 h, daß auch hier noch eine stimulierbare Sekretionsreserve besteht. Dies steht in Widerspruch zu der herkömmlicherweise oft geäußerten Meinung, die B-Zellen des insulinbedürftigen Diabetikers seien durch die vorhandene Hyperglykämie bereits maximal stimuliert und zeigten keine adaptative Mehrsekretion. Der bereits um 10.00 h erkennbare, wenn auch absolut geringfügige und um 14.00 h mit 173 % des Basalwertes erhebliche Anstieg, der auch um 21.00 h noch zu verfolgen ist, sprechen eindeutig dagegen. Möglicherweise ist die physiologische, nahrungsbedingte Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose und insulinliberierende Aminosäuren wie Arginin oder Leucin unter Einbeziehung der enterohormonal-pankreatischen Achse dem einfachen OGTT und wahrscheinlich erst recht dem nur über die Hyperglykämie wirkenden i.v. GTT hinsichtlich der Insulinfreisetzung überlegen.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen somit die Daten von FABER und BINDER (1977), die ebenfalls eine deutliche Restsekretion an C-Peptid bei juvenilen Diabetikern fanden und darüber hinaus bei diesen Patienten einen geringeren Insulinbedarf sowie stabileres Blutzuckerverhalten als bei Patienten ohne nennenswerte Insulinrestsekretion.

MADSBAD et al. (1978) fanden sogar eine signifikante negative Korrelation zwischen der Höhe der Restsekretion und dem Insulinbedarf. Die stimulierbare Restsekretion diente BEISCHER et al. (1978) im i.v. Glibenclamid-Glucose-Toleranz-Test und KRARUP und McNAIR (1978) im i.v. Glukagon-Test zur therapeutischen Entscheidung zur Sulfonylharnstoff- oder Insulintherapie. Diese Befunde lassen insgesamt die Insulinrestsekretion in einem ganz neuen Licht erscheinen: sie ist keinesfalls ein nur noch beiläufig vorhandenes Relikt der früheren Sekretionsfähigkeit des B-Zell-Apparates, sondern ist - wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen - durchaus noch in der Lage, auf Nahrungsaufnahme zu reagieren. Weiterhin kann sie - wie die Literatur zeigt - den Insulinbedarf und das Blutzuckerverhalten günstig beeinflussen und auch als prognostischer Indikator für therapeutische Entscheidungen dienen. Aus dieser Perspektive gewinnt auch

die C-Peptidbestimmung beim insulinbedürftigen Diabetiker, wie in den vorliegenden Fällen, klinische Bedeutung, da nur vermittels des C-Peptids Aufschluß über die Insulinrestsekretion zu erhalten ist.

Ein dem Verhalten der ID konträres Bild bieten die ED: während bei jenen ein auf absolut niedrigem Level fast normales Stimulationsmuster vorherrschte, finden wir hier auffällig hohe Nüchternwerte des CPR von 4,94 ng/ml, also mehr als doppelt so hoch wie normal. Diese excessiven Basalwerte sind jedoch relativ nur noch gering steigerungsfähig: der Absolutwert um 14.00 h erreicht mit 6,58 ng/ml zwar eine erhebliche Höhe, stellt aber nur 133 % des Basalwertes dar. Hier scheint schon eher die Vorstellung einer unter Basalbedingungen maximal stimulierten Insulin- und C-Peptidsekretion zuzutreffen. Die Insulinkonzentrationen im Serum zeigen ein ähnliches Verhalten, jedoch macht sich hier aufgrund der nüchtern niedrigeren Insulinwerte die adaptative Insulinfreisetzung stärker bemerkbar. Der 14.00 h-Wert stellt 227 % des Nüchterwertes dar und ist nicht wesentlich niedriger als bei den KO mit 238 %. Diese Verhältnisse sind vor allem aus den unterschiedlichen Halbwertzeiten der beiden Peptide zu erklären: die kurze HWZ des Insulins führt dazu, daß unter Basalbedingungen die Serumkonzentrationen auf sehr niedrige Werte absinken. Auf dieser Basis führt eine bestimmte, durch Sekretion hinzukommende Insulinmenge zu einem relativ stärkeren Anstieg des Serum-IRI als die äquimolare Menge C-Peptid bei dessen Serumkonzentrationen bewirkt; denn das C-Peptid fällt wegen seiner mehrfach längeren HWZ selbst unter Basalbedingungen nicht so stark ab, was sich in dem basalen molaren CPR/IRI-Quotienten von 14,84 (KO) bzw. 12,46 (ED) darstellt. Die Verhältnisse zwischen C-Peptid und Insulin werden durch diesen CPR/IRI-Quotienten gut illustriert: der Quotient liegt basal bei den ED niedriger als bei den KO, der Insulinanteil ist also höher. Dies ist als stärkere, suprabasale Sekretion gegenüber den Kontrollpersonen zu interpretieren, möglicherweise durch die Hyperglykämie induziert. Unter Stimulation im Tagesverlauf

fällt dieser Quotient bei den ED auch stärker als bei den KO: 7,20 (ED) um 14.00 h gegenüber 10,6 (KO).

Dieser Unterschied verdeutlicht den stärkeren Anstieg des Insulins gegenüber dem C-Peptid bei den ED im Vergleich zu den KO.
Die Sekretionscharakteristik der ED kann also folgendermaßen beschrieben werden: Bei sehr hohen Nüchternwerten des CPR ist über Tag nur noch eine im Vergleich zu Gesunden deutlich verminderte Sekretionsreserve vorhanden. Diese ist anhand des Insulins nicht so deutlich erkennbar, da selbst bei überdurchschnittlicher Basalsekretion die Insulinspiegel - im Vergleich zum C-Peptid - zwar erkennbar, jedoch nicht drastisch erhöht sind. So führt ein gewisses molares Quantum über Tag neu sezernierten Insulins zu absolut und relativ beträchtlichen Anstiegen. Das als konstante Überstimulation unter Basalbedingungen besser dokumentierte C-Peptid enthüllt jedoch die nur noch geringe Steigerungsfähigkeit, indem die unter Nüchternverhältnissen schon erkennbare Kumulation zu einem nur noch geringen Anstieg der Serumkonzentrationen führt.
Weiterhin ist hier noch eine möglicherweise veränderte Extraktionsrate des Insulins in der Leber zu diskutieren: so kann der niedrige basale CPR/IRI-Quotient auch durch eine Verringerung der Rezeptorbindung des Insulins in der Leber erklärt werden, die nach TERRIS und STEINER (1975) die Voraussetzung der Degradation ist und auch quantitativ damit korreliert. Die verringerte Insulinbindung in der Leber wäre dann für den unter Stimulation stärker abfallenden CPR/IRI-Quotienten als bei Gesunden mitverantwortlich. Damit wäre auch eine Erklärung für die prozentual geringe, subnormale Steigerung der Insulinspiegel über Tag bei erheblich verringertem prozentualen Anstieg des C-Peptids gegeben. Die geringere hepatische Insulinbindung führt unter Stimulation gegenüber Gesunden zu fälschlich hohen peripheren Werten. In diesem Fall wäre das C-Peptid wegen seiner geringen oder fehlenden hepatischen Extraktion der zuverlässigere und aussagekräftigere Parameter der B-Zell-Aktivität und damit

des Insulinangebots an die Leber. Seit den tierexperimentellen Arbeiten von KAHN et al. (1973) mit hyperinsulinämischen Mäusen mit Obesitas-Hyperglykämie-Syndrom ist eine massive Verringerung der hepatischen Insulinrezeptorstellen bei Insulinüberschuß bekannt, die im normo- oder hypoglykämischen Zustand reversibel ist, d.h. unter Fastenbedingungen steigt die Zahl der Insulinrezeptoren wieder an. Die Zunahme der Insulinrezeptoren während einer Gewichtsreduktion konnte durch exogenes Insulin inhibiert werden.
Mit einem entsprechenden Mechanismus könnte auch der basal schon veränderte CPR/IRI-Quotient erklärt werden.
Das bedeutet aber auch, daß das C-Peptid nicht nur als peripherer insulinäquivalenter Parameter angesehen werden kann - wenn auch mit veränderter und manchmal für Rückschlüsse auf das Insulin schwierig zu interpretierender Serumkinetik - sondern auch als Maß für das der Leber via Portalvene angebotene Insulin. Ein unter Basalbedingungen schon erniedrigter CPR/IRI-Quotient, der unter Stimulation noch stärker in den subnormalen Bereich abfällt, könnte also ein wesentlicher Hinweis auf eine verringerte hepatische Insulinbindung und konsekutiv auch erniedrigte Clearance sein.

Zum Vergleich der intraindividuellen Variabilität der C-Peptid- und Insulinspiegel im Serum sind zwei Anmerkungen zu machen: das recht grobe Raster mit nur 4 Blutentnahmen pro Tag läßt nur eine Aussage über das Niveau der Serumkonzentrationen im jeweiligen Zeitraum zu; es gibt jedoch keine Möglichkeit, aus den vorhandenen Daten abzulesen, ob ein Wert noch aus dem ansteigenden Teil der Kurve alimentärer Stimulation oder schon aus dem abfallenden Teil stammt, oder ob zufällig das Maximum getroffen wurde. Da die postprandiale Insulin- und C-Peptidfreisetzung jedoch - im Unterschied zu massiven Stimulationstests - sanfter und nachhaltiger erfolgt, werden natürlich auch länger perimaximale Spiegel in einem gewissen Zeitraum nach der Nahrungsaufnahme angetroffen, die aufgrund der gewählten Blutentnahmezeitpunkte recht zuverlässig getroffen sein dürften.

Die zweite Anmerkung betrifft die aus schon diskutierten Gründen nicht standardisierte Ernährung der Kontrollpersonen, so daß hier exogene Einflüsse durch kalorisch und qualitativ variable Ernährung sich stärker bemerkbar machen können. Wesentliche, jedoch im einzelnen nur schwer kontrollierbare Unterschiede des Insulinbedarfs resultieren aus den bekannten Einflüssen kontrainsulinärer Hormone wie Glukagon, Katecholamine, Cortisol und STH. Noch unüberschaubarer, aber ebenfalls von gesicherter Bedeutung sind Tonusschwankungen des vegetativen Nervensystems (PORTE et al. (1973), Streßfaktoren und intestinale Resorptions- und Motilitätsschwankungen. Überhaupt darf man bei der Diskussion dieser Zusammenhänge nicht vergessen, daß das Insulin ja kein Hormon eines selbstgesteuerten feedback-Systems ist, sondern auf dem Umweg über Blutglucoseveränderungen ganz unterschiedlicher Genese gesteuert wird und somit naturgemäß recht große Ausschläge zeigt.
Weiterhin spielt die körperliche Aktivität eine große Rolle für die Verringerung des aktuellen Insulinbedarfs, so daß sie sogar in das therapeutische Konzept der Diabetikerbehandlung einbezogen wird.
Die genannten Ursachen führen zu starken Schwankungen des IRI i.S., so daß die zwischen 40,6 und 52,9 % betragenden iVK des IRI i.S. bei den Kontrollpersonen weit größer sind, als bei den ED mit 33,6 - 45, 1 %. Die Ursachen hierfür sind wohl vor allem in der strengen Diät der ED zu suchen. Die Schwankungen sind jedoch erheblich und es bedeutet eine beträchtliche Einschränkung der Aussagezuverlässigkeit von Insulinbestimmungen i.S., wenn selbst die Nüchternwerte von Kontrollpersonen durchschnittliche Abweichungen von ca. $\pm$ 40 % zeigen.
Hierfür sind neben den schon diskutierten Veränderungen des Insulinbedarfs vor allem auch die kurze Halbwertzeit des Insulins und dessen diskontinuierliche Freisetzung (spiking) aus dem Pankreas verantwortlich (HANSEN et al. 1977; VRONTAKIS et al. 1977), die zu deutlichen Oszillationen des Seruminsulins führt.

Im Vergleich damit liegen die Verhältnisse beim C-Peptid wesentlich günstiger: der iVK des CPR i.S. bewegte sich bei den KO zwischen 17 und 31,8 %, den ED zwischen 17,7 und 25,3 % und bei den ID zwischen 31,8 und 46,9 %. Der iVK der Flächen unter dem CPR i.S. beträgt (in gleicher Reihenfolge) 18,1 %, 12,6 % und 26,7 %.
Auch hier sind die täglichen Abweichungen bei den ED wieder geringer als bei den KO, was mit dem gleichen Mechanismus wie beim Insulin erklärt werden kann.
Auffällig ist jedoch, daß die iVK des IRI i.S. etwa doppelt so hoch liegen wie die des CPR i.S., denn alle bereits angeführten Argumente über Einflüsse auf den Insulinbedarf betreffen natürlich die pankreatische C-Peptidfreisetzung gleichermaßen. Hier macht sich vor allem die längere Halbwertzeit des C-Peptid bemerkbar, die u.a. dazu führt, daß die Nüchternkonzentrationen (auf molarer Basis) bereits ca. 15mal so hoch sind wie beim Insulin. Dadurch fallen gleiche molare Mengen neu sezernierten Insulins und C-Peptids bei diesem viel geringer ins Gewicht, was sich dann auch in geringeren täglichen Abweichungen manifestiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß der Zielparameter der Insulinsekretion die aktuelle Blutglucosekonzentration ist. Dabei wirken eine Fülle modifizierender Bedingungen endogener und exogener Art auf den Insulinbedarf und führen zu erheblichen Abweichungen der im Serum gemessenen Insulinkonzentrationen von Tag zu Tag. Die Sekretion des sozusagen akzessorisch freigesetzten C-Peptids unterliegt im Prinzip selbstverständlich den gleichen Einflüssen. Aufgrund differenten Metabolismus, wobei vor allem die fehlende hepatische Degradation im Vordergrund steht, schlagen diese Einflüsse jedoch viel geringer zu Buche, so daß die von Tag zu Tag gemessenen Abweichungen der C-Peptidspiegel im Serum nur etwa halb so groß sind wie beim Insulin. Damit bietet sich das C-Peptid i.S. für Studien der B-Zell-Stimulation im Tagesverlauf mit relativ weitem Raster als der zuverlässigere Parameter an.

Die bei den drei Gruppen gemessene Harnausscheidung des CPR mit 44,16 µg/die (KO), 53,95 ug/die (ED) und 11,46 ug/die (ID) unterschied sich deutlich voneinander, ebenso wie die ermittelten Serumwerte. Einflüsse etwaiger renaler Störfaktoren können weitestgehend ausgeschlossen werden, insbesondere auch die diabetische Nephropathie Kimmelstiel-Wilson, da Patienten mit entsprechenden Symptomen nicht in die Untersuchung aufgenommen wurden (siehe 3.3.). Es fällt auf, daß die Unterschiede zwischen der CPR-Harnausscheidung der KO und der ED nicht ganz so groß sind wie diejenigen der entsprechenden Serumkonzentrationen. Dieser Befund ist schwer zu interpretieren, da auswertungsbedingte Differenzen hier nicht auftreten können, denn die Mittelwerte und Standardabweichungen sowohl für Serumwerte wie auch für die CPR-Harnausscheidung wurden auf logarithmischer Basis errechnet (siehe 4.1.).

Eine plausible Erklärung wäre in einem Sättigungsverhalten der renalen C-Peptid-Ausscheidung bei hohen Serumkonzentrationen zu suchen und damit wäre aber ein Hinweis auf einen aktiven, energieverbrauchenden Prozeß der renalen C-Peptidausscheidung gegeben. Die von KATZ und RUBENSTEIN (1973) tierexperimentell an der Rattenniere erhobenen Befunde können diese Hypothese jedoch nicht stützen, denn sie maßen bei Serumkonzentrationen bis zu 25 ng/ml (wie sie beim Menschen nur bei Insulinomträgern denkbar sind) konstante avD-Werte des C-Peptids.
Beim Vergleich der KO mit den ID ergeben sich jedoch solche Unterschiede nicht: die Unterschiede im Niveau der Serumkonzentrationen entsprechen denen bei der Harnausscheidung. Dies spricht dafür, daß es sich um besondere Verhältnisse bei den ED handeln dürfte.

Beim Vergleich der eigenen Ergebnisse mit in der Literatur erwähnten Resultaten fällt eine große Spannweite auf, obwohl alle angeführten Autoren mit demselben CPR-RIA nach KANEKO (1974) arbeiteten: so maßen HORWITZ et al. (1977) bei gesunden Probanden 36 µg/die CPR-Ausscheidung, wohingegen KUZUYA et al. (1976) ca. 90 µg/die für ein Kollektiv gesunder Probanden angaben und

später ähnlich hohe Werte mit 81 µg/die maßen. Es gibt bislang keine hinreichende Erklärung für diese Diskrepanzen, außer evtl. unterschiedlicher Körpergröße und -gewicht, zumal KUZUYA et al. (1976) als Nüchternkonzentration im Serum ihrer Probanden 2,45 ng/ml angaben, ein Wert, der gut mit den von uns gemessenen 2,25 ng/ml übereinstimmt und deutliche Veränderungen der allgemeinen metabolischen Ausgangssituation unwahrscheinlich erscheinen läßt.

Wenn man den Anteil der nächtlichen Sammelfraktion IV an der gesamten Tagesausscheidung des C-Peptids betrachtet, fallen erhebliche Abweichungen bei den ED gegenüber dem Verhalten der Kontrollpersonen wie der ID auf: die CPR-Ausscheidung in der nächtlichen Sammelperiode beträgt 26,7 % der Tagesausscheidung, wohingegen sie sich bei den KO auf 18,0 und den ID auf 19,5 % beläuft. Hier fällt der überdurchschnittliche Anteil der Basalausscheidung an der gesamten CPR-Exkretion auf, der somit die bereits im Serum gefundenen hohen Nüchternkonzentrationen bestätigt. Bemerkenswert ist auch der mit 19,5 % in der Größenordnung von Kontrollpersonen liegende Anteil der Basalausscheidung bei den ID. Dies bedeutet eine noch verfügbare Stimulationsreserve in Höhe von 41,5 % der gesamten Tagesausscheidung, da die über 8 Stunden ermittelte Basalausscheidung auf 24 Std. hochgerechnet nur 58,5 % der Gesamtmenge ergibt. Die Sekretionsreserve der ED - ebenfalls über die CPR-Ausscheidung bestimmt - beträgt vergleichsweise nur 19,9 %.

Dies kann - mit aller Vorsicht und unter Berücksichtigung des absoluten Niveaus - als vorwiegend quantitative Störung der Insulinsekretion bei den insulinpflichtigen Diabetikern und als demgegenüber auch qualitativ veränderte Sekretion bei Erwachsenendiabetikern interpretiert werden.

Die beschriebenen Parallelen zwischen Serumkonzentrationen und Harnausscheidung des CPR ließen sich auch statistisch sichern: die Fläche unter der CPR-Kurve i.S. (als integraler Parameter der C-Peptidsekretion über Tag) und die Harnausscheidung des CPR korrelierten in der Gesamtheit aller untersuchten Personen mit einem $r = 0{,}83$ statistisch signifikant. Die Korrelation lag

in einzelnen Kollektiven zwar deutlich niedriger, doch spricht dies nicht gegen den linearen Zusammenhang zwischen CPR i.S. und CPR i.H., sondern ist das Ergebnis der mathematischen Operation: das Kollektiv der ED zeigte - wie aus Abb. 16 im Anhang ersichtlich - eine derart homogene Verteilung, daß die kompakte Punktwolke keine höhere, durch Streckung entlang der Regressionsgeraden erst zustande kommende, Korrelation erlaubte.

In der Zusammenstellung aller drei Gruppen mit Werten von dicht über der Meßgrenze bis in den supranormalen Bereich hinein ist diese Einschränkung nicht gegeben. Daraus kann abgeleitet werden, daß unter Berücksichtigung der biologischen Variabilität zwischen den CPR-Spiegeln im Serum und der CPR-Harnausscheidung ein linearer Zusammenhang besteht. Das bedeutet, daß aus der gemessenen CPR-Ausscheidung zuverlässige Rückschlüsse auf das Serum-CPR gezogen werden können, die wiederum Rückschlüsse auf das verfügbare Insulin geben können, wobei man allerdings die unterschiedliche Degradierung und Kinetik des Insulins nicht vernachlässigen darf.

Der hier nachgewiesene Zusammenhang zwischen CPR i.S. und CPR i.H. ließ jedoch die Frage offen, ob die im Serum beobachteten Schwankungen von Tag zu Tag im Harn in einer vergleichbaren Größenordnung liegen. Deshalb wurde der iVK der Fläche unter CPR i.S., der Fläche unter IRI i.S. sowie des CPR i.H. berechnet. Dabei zeigten sich fast identische Werte für CPR i.S. und CPR i.H., während das IRI i.S. eine annähernd doppelt so hohe biologische Variabilität von Tag zu Tag aufwies wie das CPR i.S. Der iVK des CPR i.S. der Kontrollpersonen zeigt gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von HORWITZ et al. (1977), die bei zwei isokalorisch ernährten Freiwilligen über 4 Wochen einen VK der CPR-Ausscheidung im Harn von 22 bzw. 32 % ermittelten.

Dieselben Autoren errechneten einen Anteil von 5 % der gesamten Tagessekretion des C-Peptids, der als intaktes C-Peptid im Harn ausgeschieden wird (HORWITZ et al. 1977). Ausgehend von diesem Wert wurde die im Harn gemessene C-Peptidmenge in

die entsprechende Insulinmenge umgerechnet: danach ergab sich für das Kollektiv der Kontrollpersonen eine durchschnittliche tägliche Insulinsekretion von 40,1 IE/die, für die ED von 49,0 IE/die und für die ID von 10,4 IE/die. Die nächtliche Basalausscheidung beläuft sich - umgerechnet auf die Insulinsekretion - bei den KO auf 7,2, bei den ED auf 13,1 und bei den ID auf 2,0/8 Std.
SHERWIN et al. (1974) errechneten eine tägliche basale Insulinsekretion des Pankreas von 24 IE/24 Std., d.h. 1 IE/Std. Rechnet man nun die Basalausscheidung unserer Probanden hoch, so ergibt sich für die KO eine theoretisch sezernierte Insulinmenge von 21,2 IE/24 Std., für die ED von 39,3 IE/24 Std. und für die ID von 6 IE/24 Std.

9. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Bei drei Gruppen von Untersuchten - 8 Kontrollpersonen, 5 insulinbedürftigen Diabetikern und 5 Erwachsenendiabetikern - wurde an 6 Tagen die C-Peptidausscheidung im Harn gemessen. Gleichzeitig wurden im Serum 4mal täglich C-Peptid und Insulin gemessen.
C-Peptid und Insulin im Serum korrelierten signifikant miteinander. C-Peptid im Serum und im Harn waren ebenfalls statistisch signifikant miteinander korreliert.
Die Ausscheidung des C-Peptids im Harn repräsentiert sowohl die unterschiedliche Höhe der Serumwerte der 3 Kollektive wie auch die tageszeitlichen Schwankungen.
Erwachsenendiabetiker zeigten eine erhöhte Basalsekretion, die sich einerseits in erhöhten Nüchternwerten des CPR und IRI im Serum wie andererseits in einer erhöhten nächtlichen Ausscheidung des CPR im Harn manifestierte. Die biologische Variation der Insulinspiegel im Serum während des Untersuchungszeitraumes war annähernd doppelt so hoch wie die des C-Peptids im Serum und Harn. Die endogene biologische Variation der C-Peptidspiegel im Serum sowie der C-Peptidausscheidung im Harn liegt in einer Größenordnung, daß mit 1-2-maliger Bestimmung unter standardisierten Bedingungen zufriedenstellende Informationen zu erwarten sind.

Daraus läßt sich ableiten, daß die C-Peptidausscheidung im Harn sich anbietet

1. als Parameter zur Verlaufsbeobachtung der Insulinsekretionsreserve bei nicht insulinbedürftigen Erwachsenendiabetikern und darüberhinaus als zusätzliche Information zur Beurteilung des sog. Sekundärversagens,
2. zur Verlaufsbeobachtung des juvenilen Diabetikers, vor allem bei den häufigen, initialen Remissionsperioden sowie zur Kontrolle der Insulinrestsekretion, die nach neueren Erkenntnissen eine wichtige Rolle bei der guten Einstellbarkeit eines Diabetes mellitus spielt.

Weiterhin kann man

3. anhand einer erhöhten nächtlichen Basalausscheidung des CPR bei Erwachsenendiabetikern einen erhöhten endogenen Insulinbedarf erkennen.

Die Bestimmung des C-Peptids im Harn stellt somit eine Bereicherung in der Diagnostik der Funktionszustände der B-Zellen des Pankreas dar.

10. LITERATURVERZEICHNIS

ALTSZULER, N.: Modifications of the effects of insulin by hormonal factors. In: Insulin II, Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXXII/2 Hrsg.: A. Hasselblatt und F.v. Bruchhausen Berlin, Heidelberg, New York 1975

BEISCHER, W., KELLER, L., RAPTIS, S., KERNER, W., PFEIFFER, E.F.: Human C-peptide, Part. II: Clinical studies. Klin. Wschr. 54, 717 (1976)

BEISCHER, W., KELLER, L., HEINZE, E., KERNER, W., JONATHA, E.M., PFEIFFER, E.F.: The relevance of extremely high serum C-peptide concentrations in three cases of juvenile diabetes mellitus. Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977,Hrsg.: J. Beyer, U. Krause, W. Naegele

BEISCHER, W., KERNER, W., RAPTIS, S., KELLER, L., BEISCHER, B., PFEIFFER, E.F.: Insulin therapy in relation to circulating C-peptide levels. Diabetes 27, (Suppl. 1) 235 (1978)

BEISCHER, W., KERNER, W., RAPTIS, S., HERFURTH, C., PFEIFFER, E.F.: Does insulin play a role in the regulation of its own secretion? Horm. Metab. Res. 10(2), 168 (1978)

BERSON, S.A., YALOW, R.S.: Quantitative aspects of reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. clin. Invest. 38, 1996 (1959)

BEYER, J., CORDES, U., KRAUSE, U.: The clinical importance of C-peptide determination. Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977, Hrsg.: J. Beyer, U. Krause, W. Naegele

BLOCK, M.B., MAKO, M.E., STEINER, D.F., RUBENSTEIN, A.H.:
Circulating C-peptide immunoreactivity. Studies in normal and diabetic patients.
Diabetes 21, 1013 (1972)

BLOCK, M.B., ROSENFIELD, B.L., MAKO, M.E., STEINER, D.F., RUBENSTEIN, A.H.:
Sequential changes in ß-cell function in insulin treated diabetic patients assessed by C-peptide immunoreactivity.
New Engl. J. Med. 288, 1144 (1973)

BLUNDELL, T.L., DODSON, G.G., HODGKIN, D.C., MERCOLA, D.:
Insulin: The structure in the crystals and its reflections in chemistry and biology.
Adv. in Prot. Chem. 26, 279 (1972)

CHALLONER, D.R., YU, P.:
Differential effects of porcine proinsulin on rat epididymal fat cells and fat pieces.
Diabetes 19, 289 (1970)

CHAMBERLAIN, M.J., STIMMLER, L.:
The renal handling of insulin.
J. clin. Invest. 46, 911 (1967)

CHANCE, R.E., ELLIS, R.M., BROMER, W.W.:
Porcine proinsulin: Characterization and amino acid sequence.
Science 161, 165 (1968)

CHANCE, R.E.:
Chemical, physical, biological and immunological studies on porcine proinsulin and related polypeptides.
In: Proc. 7th Congr. Int. Diab. Fed., Hrsg.: R.R. Rodriguez und J.J. Vallance-Owen.
Excerpta Medica Amsterdam 292 (1971)

CLARK, J.L., CHO, S., RUBENSTEIN, A.H., STEINER, D.F.: Isolation of a proinsulin connecting peptide fragment (c-peptide) from bovine and human pancreas. Biochem. biophys. Res. Comm. 35, 456 (1969)

CONSTAN, L.L., MAKO, M.E., RUBENSTEIN, A.H., STEINER, D.F.: Urinary proinsulin. Diabetes 19, 359 (1970)

CORDES, U., KRAUSE, U., BEYER, J.: The use of C-peptide estimation in the diagnosis of insulinoma. Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977, Hrsg.: J. Beyer, U. Krause, W. Naegele

CORTNEY, M.A., SAWIN, L.L., WEISS, D.D., Renal tubular protein absorption in the rat. J. clin. Invest. 49, 1 (1970)

CRESTO, J.C., LAVINE, R.L., FINK, G., RECANT, L.: Plasma proinsulin. Comparison of insulin specific protease and gel filtration assays. Diabetes 23, 505 (1974)

DUNBAR, J.C., McLAUGHLIN, W.J., WALSH, M.F., FOA, P.P.: Insulin secretion and glucose uptake by isolated islets of the hamster. Effect of insulin, proinsulin, and C-peptide. Horm. Metab. Res. 8, 1 (1976)

EL-ALLAWY, R.M.M., SONNE, O., GLIEMANN, J., ØRSKOV, H., JOHANSEN, K.: The excretion of insulin in urine. Diabetologia 12, 523 (1967)

FABER, O.K., BINDER, C., MARKUSSEN, J., HEDING, L.G., NAITHANI, V.K., KUZUYA, H., BLIX, P., HORWITZ, D.L., RUBENSTEIN, A.H.:
Characterization of seven C-peptide antisera.
Diabetes 27 (Suppl. 1), 170 (1978)

FABER, O.K., MARKUSSEN, J., NAITHANI, V.K.:
C-peptide kinetics in man.
Diabetologia 12, 401 (1976)(Abstract)

FAULHABER, J.D., DITSCHUNEIT, H.:
The biological assay of insulin-like serum activity (ILA).
In: Insulin II, Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXXII/2, Hrsg.: A. Hasselblatt und F.v. Bruchhausen
Berlin, Heidelberg, New York 1975

FINK, G., CRESTO, J.C., GUTMAN, R.A., LAVINE, R.L., RUBENSTEIN, A.H., RECANT, L.:
Plasma proinsulin-like material in insulin treated diabetics.
Horm. Metab. Res. 6, 439 (1974)

FRANK, B.H., VEROS, A.J.:
Interaction of zinc with proinsulin
Biochem. biophys. Res. Comm. 32, 155 (1970)

FRIER, B.M., FABER, O.K., BINDER,C., ELLIOTT, H.L.:
The effects of residual insulin secretion on exocrine pancreatic function in juvenile-onset diabetes mellitus.
Diabetologia 14, 301 (1978)

GIVOL, D., DE LORENZO, F., GOLDBERGER, R.F., ANFINSEN, C.B.:
Disulfid interchanges and the three dimensional structure of proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 53, 676 (1965)

GLIEMANN, J., SØRENSEN, H.H.: Assay of insulin-like activity by the isolated fat cell method. IV: The biological activity of pro-insulin. Diabetologia 6, 499 (1970)

GLIEMANN, J.: GAMMELTOFT, S.: The biological activity and the binding affinity of modified insulins determined on isolated rat fat cells. Diabetologia 10, 105 (1974)

GRÜNEKLEE, D., HEDTMANN, A.: Immunoassay of C-peptide in urine of patients with idiopathic diabetes and after pancreatectomy. Proc. 1st Int. Symp. C-peptide Mainz 1977, Hrsg.:J. Beyer, U. Krause, W. Naegele

HANSEN, B.W., KOERKER, D.J., GODDNER, C.J., BROWN, A.C., RUBENSTEIN, A.H.: Evidence for oscillating secretion of insulin in M. mulatta, its metabolic consequences and damping with starvation. Endocrinology 100 (Suppl.), 104 (1977)

HEDING, L.G., MUNKGAARD RASMUSSEN, S.: Human C-peptide in normal and diabetic subjects. Diabetologia 11, 201 (1975a)

HEDING, L.G.: Radioimmunological determination of human C-peptide in serum. Diabetologia 11, 541 (1975b)

HEDING, L.G., DAHL LARSEN, U., MARKUSSEN, J., NAITHANI, V.K.: Human plasma C-peptide assay, sources of errors and examples of its use. Diabetologia 11, 348 (1975) (Abstract)

HEDING, L.G.: Specific and direct radioimmunoassay for human proinsulin in serum. Diabetologia 13, 467 (1977)

HEDING, L.G.:
Insulin, C-peptide and proinsulin in nondiabetics and insulin-treated diabetics. Characterization of the proinsulin in insulin-treated diabetics.
Diabetes 27 (Suppl. 1), 178 (1978)

HELLMANN, B., TÄLJEDAL, J.B.:
Effects of sulfonylureas derivatives on pancreatic ß-cells.
In: Insulin II, Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXXII/2
Hrsg.: A. Hasselblatt und F.v. Bruchhausen
Berlin, Heidelberg, New York 1975

HENDRIKSEN, C., FABER, O.K., DREJER, J., BINDER, C.:
Prevalence of residual B-cell function in insulin treated diabetics evaluated by the plasma C-peptide response to intravenous glucagon.
Diabetologia 13, 615 (1977)

HORWITZ, D.L., STARR, J.I., RUBENSTEIN, A.H., STEINER, D.F.:
Serum connecting peptide - an indicator of beta-cell secretory function.
Diabetes 22 (Suppl. 1), 298 (1973)

HORWITZ, D.L., STARR, J.I., MAKO, M.E., BLACKARD, W.G., RUBENSTEIN, A.H.:
Proinsulin, insulin and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood.
J. clin. Invest. 55, 1278 (1975)

HORWITZ, D.L., KUZUYA, H., RUBENSTEIN, A.H.:
Circulating serum C-peptide: A brief review of diagnostic implications.
New Engl. J. Med. 295, 207 (1976)

HORWITZ, D.L., RUBENSTEIN, A.H., KATZ, A.J.:
Quantitation of human pancreatic beta-cell function by immunoassay of C-peptide in urine.
Diabetes 26, 30 (1977)

JASPAN, J.B., MAKO, M.E., KUZUYA, H., BLIX, P.M., HORWITZ, D.L., RUBENSTEIN, A.H.:
Abnormalities in circulating beta-cell peptides in chronic renal failure: comparison of C-peptide, proinsulin and insulin.
J. clin. Endocrin. Metab. 45,3, 441 (1977)

JOHNSTON, D.J., ALBERTI, K.G.M., WRIGHT, R.:
Mechanism of hyperinsulinism of cirrhosis.
Diabetologia 12, 401 (1976)

JOHNSTON, D.G.:
C-peptide and insulin in liver disease.
Diabetes 27 (Suppl. 1), 201 (1978)

JØRGENSEN, K.R.:
Immunoassay of insulin in human urine.
Acta Endocrinologica 51, 400 (1966)

KANEKO, T., OKA, H., MUNEMURA, M., ODA, T., YAMASHITA, K., SUZUKI, S., YANAIHARA, N., HASHIMOTO, T., YANAIHARA, C.:
Radioimmunoassay of human proinsulin C-peptide.
Endocrinology Jap. 21, 141 (1974)

KANEKO, T., MUNEMURA, M., OKA, H., ODA, T., SUZUKI, S., YANAIHARA, N., NAGAKAWA, S., MAKABE, K.:
Demonstration of C-peptide immunoreactivity in various body fluids and clinical evaluation of the determination of urinary C-peptide immunoreactivity.
Endocrinology Jap. 22,3, 207 (1975)

KAPLAN, N., MADISON, L.L.:
Effects of endogeneous insulin secretion on the magnitude of hepatic binding of labeled insulin during a single transhepatic circulation in human subjects.
Clin. Res. 7, 248 (1959)

KATZ, A.J., RUBENSTEIN, A.H.: Metabolism of proinsulin, insulin and C-peptide in the rat. J. clin. Invest. 52, 1113 (1973)

KEMMLER, W., PETERSON, J.D., STEINER, D.F.: Studies on the conversion of proinsulin to insulin. I. Conversion in vitro with trypsin and carboxypeptidase B. J. Biol. Chem. 246, 6786 (1971)

KEMMLER, W., STEINER, D.F., BORG, J.: Studies on the conversion of proinsulin to insulin. III. Studies in vitro with a crude secretion granule fraction isolated from islet of Langerhans. J. Biol. Chem. 248, 4544 (1973)

KENNY, A.J.: Metabolism of peptide hormones. Brit. Med. Bull. 16, 202 (1960)

KITABCHI, A.E., STENTZ, F.B.: Degradation of insulin and proinsulin by various organ homogenates of rat. Diabetes 21, 1091 (1972)

KITABCHI, A.E.: The biological and immunological properties of pork and beef insulin, proinsulin and connecting peptide. J. clin. Invest. 49, 979 (1970)

KLOSTERMEYER, H., ZAHN, H.: Struktur, Eigenschaften und Synthese des Insulins. In: Insulin I, Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXXII/2, Hrsg.: E. Dörzbach Berlin, Heidelberg, New York 1971

KNICK, B.,
PANITZ, N.:

C-peptide estimations under various stimulation tests and their evidence for the antidiabetic therapy of adult diabetes and in the diagnosis of insulinoma.
Proc. 1st Int. Symp. C-peptide Mainz 1977,Hrsg.: J.Beyer, U. Krause, W. Naegele

KOHNERT, K.D.,
ZIEGLER, M.,
ZÜHLKE, H.,
FIEDLER, H.:

Isoelectric focussing of proinsulin and intermediates in polyacrylamide gel.
FEBS Letters 28, 177 (1972)

KOHNERT, K.D.,
ZÜHLKE, H.,
ZIEGLER, M.,
SCHMIDT, S.:

Isolierung und partielle Charakterisierung von Kristall-Insulin sowie proinsulinhaltiger b-Komponenten aus Human-Pankreas.
Acta Biol. Med. Germ. 31, 515 (1973)

KRAUSE, U.,
CORDES, U.,
BEYER, J.:

Erhöhte Serum-C-Peptid-Spiegel bei insulinpflichtigen Altersdiabetikern.
Vortrag auf dem 11. Kongr. der Dtsch. Diab. Ges.,Braunlage 1976

KRAUSE, U.:

Calculation of the half-life of C-peptide on the basis of basal serum C-peptide and insulin levels.
Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977

KRAUSE, U.,
CORDES, U.,
BEYER, J.:

C-Peptid, Sekretion und Stoffwechsel bei unterschiedlichen Funktionszuständen und Störungen der ß-Zellen der Langerhansschen Inseln.
Dtsch. med. Wschr. 102, 785 (1977)

KUZUYA, T.,
MATSUDA, A.:
Disappearance rate of endogenous human C-peptide from blood.
Diabetologia 12, 519 (1976)

KUZUYA, T.,
BLIX, P.M.,
HORWITZ, D.L.,
STEINER, D.F.,
RUBENSTEIN, A.H.:
Determination of free and total insulin and C-peptide in insulin-treated diabetics.
Diabetes 26, 22 (1977)

KUZUYA, T.,
MATSUDA, A.,
SAITO, T.,
YOSHIDA, S.:
Human C-peptide immunoreactivity (CPR) in blood and urine - evaluation of a radioimmunoassay method and its clinical applications.
Diabetologia 12, 511 (1976)

LAZARUS, N.R.,
PENHOS, J.C.,
TANESE, T.,
MICHAELS, L.,
GUTMAN, R.A.,
RECANT, L.:
Studies on the biological activity of procine proinsulin.
J. clin. Invest. 49, 487 (1970)

LUDVIGSSON, J.,
HEDING, L.G.:
C-peptide in children with diabetes.
Diabetologia 12, 627 (1976)

LYNGSØE, J.:
Seruminsulin.
Aarhus 1965

MASHITER, K.,
KING, T.M.:
Changes of immunoreactivity of pro-insulin induced by rat tissue extracts.
Nature (London) 224, 696 (1969)

MATSCHINSKY, F.M.,
ELLERMANN, J.,
STILLINGS, S.,
RAYBAUD, F.,
PACE, C.,
ZAWALICH, W.:
Hexoses and insulin secretion.
In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie XXXII/2
Hrsg.: A. Hasselblatt und F.v. Bruchhausen,
Berlin, Heidelberg, New York 1975

MELANI, F., RUBENSTEIN, A.H., OYER, P.C., STEINER, D.F.:
Identification of proinsulin and C-peptide in human serum by a specific immunoassay.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 67, 148 (1970)

MIROUZE, J., SELAM, J.L., PHAM, T.C., MENDOZA, E., ORSETTI, A.:
Sustained insulin-induced remission of juvenile diabetes by means of an external artificial pancreas.
Diabetologia 14, 223 (1978)

MORTIMORE, G.E., TIETZE, F., STETTEN, D.:
Metabolism of Insulin-^{131}J; studies in isolated perfused rat liver and hind limb.
Diabetes 8, 307 (1959)

NAITHANI, V.K.:
Studies on polypeptides.
I. The synthesis of C-peptide of porcine proinsulin.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1806 (1972)

NAITHANI, V.K.:
Studies on polypeptides.
IV. The synthesis of C-peptide of human proinsulin.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 659 (1973)

NARAHARA, H.T.:
Biological activity of proinsulin.
In: Insulin Action
Hrsg.: I. Fritz
New York 1972

OLEFSKY, J.D., REAVEN, G.M.:
Insulin and glucose responses to identical oral glucose tolerance tests performed fourty-eight hours apart.
Diabetes 23, 449 (1974)

OYER, P.E., CHO, S., PATTERSON, J.E., STEINER, D.F.: Studies on human proinsulin. Isolation and amino-acid sequence of the human pancreatic C-peptide. J. Biol. Chem. 246, 1375 (1971)

PORTE, D. jr., GIRADIER, L., SEYDOUX, J., KANAGAWA, Y., POSTERNAK, J.: Neural regulation of insulin secretion in the dog. J. clin. Invest. 52, 210 (1973)

RABKIN, R., KITABCHI, A.E.: Factors influencing the handling of insulin by the isolated rat kidney. J. clin. Invest. 62(1), 169 (1978)

RABKIN, R., ROSS, B.D., MAKO, M.E., RUBENSTEIN, A.H.: The handling of insulin, proinsulin, and C-peptide by the isolated rat kidney. Diabetes 27, Suppl. 1 192 (1978)

RABKIN, R., RUBENSTEIN, A.H., COLWELL, J.A.: Glomerular filtration and proximal tubular absorption of insulin ^{125}J. Am. J. Physiol. 223, 1093 (1972)

REGEUR, L., BINDER, C.: The correlation between plasma C-petide and kidney function. Diabetologia 12, 416 (1976) (Abstract)

RUBENSTEIN, A.H.: Characterization of seven C-peptide antisera. Diabetes 27 (Suppl. 1), 170 (1978)

RUBENSTEIN, A.H., BLOCK, M.B., STARR, J., MELANI, F., STEINER, D.F.: The renal extraction and excretion of proinsulin. J. Lab. Clin. Med. 76, 868 (1970)

RUBENSTEIN, A.H., LOWY, C., WELBORN, T.A., FRASER, T.R.: Urine insulin in normal subjects. Metabolism 16, 234 (1967a)

RUBENSTEIN, A.H., LOWY, C., FRASER, T.R.: Radioimmunoassay of insulin in urine. Diabetologia 3, 453 (1967b)

RUBENSTEIN, A.H., CHO, S., STEINER, D.F.: Evidence for proinsulin in human urine and serum. Lancet I, 2, 1353 (1968)

RUBENSTEIN, A.H., SPITZ, I.: Role of the kidney in insulin metabolism and excretion. Diabetes 17, 161 (1968)

RUBENSTEIN, A.H., CLARK, J.L., MELANI, F., STEINER, D.F.: Secretion of proinsulin C-peptide by pancreatic B-cells and its circulation in blood. Nature 224, 697 (1969a)

RUBENSTEIN, A.H., STEINER, D.F., CHO, S., LAWRENCE, A.M., KIRSTEINS, L.: Immunological properties of bovine proinsulin and related fractions. Diabetes 18, 598 (1969b)

RUBENSTEIN, A.H.: The significance of immunoassayable insulin in urine. JAMA 209,2, 254 (1969c)

RUBENSTEIN, A.H., BLOCK, M.B., STARR, J., MELANI, F., STEINER, D.F.: Proinsulin and C-peptide in blood. Diabetes 21 (Suppl.2), 661 (1972a)

RUBENSTEIN, A.H., POTTENGER, L.A., MAKO, M.E., GETZ, G.S., STEINER, D.F.: The metabolism of proinsulin and insulin by the liver. J. clin. Invest. 51, 912 (1972b)

RUBENSTEIN, A.H., MELANI, F., STEINER, D.F.: Circulating proinsulin: immunology measurement and biological activity. In: Handbook of physiology, Endocrinology I (Eds.: D.F. Steiner and N. Freinkel) Baltimore 1972

SAMOLS, E.,
RYDER, J.A.:
Studies in tissue uptake of insulin in man using a differential immunoassay for endogenous and exogenous insulin.
J. clin. Invest. 40, 2092 (1961)

SANDO, H.,
BORG, J.,
STEINER, D.F.:
Studies on the secretion of newly synthesized proinsulin and insulin from isolated rat islets.
Diabetes 20 (Suppl.1), 334 (1971)

SANDO, H.,
GRODSKY, G.M.:
Dynamic synthesis and release of insulin and proinsulin by perfused islets.
Diabetes 22, 354 (1973)

SANGER, F.,
THOMPSON, E.O.P.,
KITAI, R.:
The amide groups of insulin.
Biochem. J. 59, 509 (1955)

SENATOR, G.B.,
RAINBOW, S.J.,
GREENWOOD, R.H.,
MAHLER, R.F.,
WOODHEAD, J.S.,
HALES, C.M.:
Plasma C-peptide measurement in the diagnosis of pancreatic insulinoma with special reference to insulin induced hypoglycemia.
Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977, Hrsg.: J. Beyer, U. Krause, W. Naegele

SHERWIN, R.S.,
KRAMER, K.J.,
TOBIN, J.D.,
INSEL, P.A.,
LILJENQUIST, J.E.,
BERMAN, M.,
ANDRES, R.:
A model of the kinetics of insulin in man.
J. clin. Invest. 53, 1481 (1974)

SIEGMUND, R.,
ZICK, R.,
SCHWEER, H.H.,
THOMAS, T.,
MITZKAT, H.J.:
C-peptide levels in serum after intravenous glucose stimulation in patients with terminal renal failure.
Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977, Hrsg.: J. Beyer, U. Krause, W. Naegele

SÖNKSEN, P.H., TOMPKINS, C.V., SRIVASTAVA, M.C., NABARRO, J.D.N.: A comparative study on the metabolism of human insulin and porcine proinsulin in man. Clin. Sci. Molecul.Med. 45, 633 (1973)

STARR, J.I., RUBENSTEIN, A.H.: Metabolism of endogenous proinsulin and insulin in man. J. clin. Endocrinol. Metab. 38, 305 (1974)

STARR, J.I., JUHN, D.J., STEINER, D.F., RUBENSTEIN, A.H.: Posthepatic delivery rates of proinsulin and insulin in normal subjects. J. clin. Invest. 52, 81 (1973) (Abstract)

STARR, J.I., JUHN, D.J., RUBENSTEIN, A.H., KITABCHI, A.E.: Degradation of insulin in serum by insulin specific protease. J. Lab. Clin. Med. 86, 631 (1975)

STEINER, D.F.: On the role of proinsulin C-peptide. Diabetes 27 (Suppl.1), 145 (1978)

STEINER, D.F., CUNNINGHAM, D.D., SPIGELMAN, L., ATEN, B.: Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. Science 157, 697 (1967)

STEINER, D.F., OYER, P.E.: The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 57, 463 (1967)

STEINER, D.F., CLARK, J.L., NOLAN, D., RUBENSTEIN, A.H., MARGOLIASH, E., MELANI, F., OYER, P.E.: The biosynthesis of insulin and some speculations regarding the pathogenesis of human diabetes. In: The pathogenesis of diabetes mellitus. Proc. 13th Nobel Symp. Stockholm 1970

STEINER, D.F., CLARk, J.L., NOLAN, C., RUBENSTEIN, A.H., MARGOLIASH, E., ATEN, B., OYER, P.E.:
Proinsulin and the biosynthesis of insulin.
Rec. Progr. Horm. Res. 25, 207 (1969)

STEINER, D.F., PETERSON, J.D., TAGER, H.S.:
Comparative aspects of proinsulin and insulin structure and biosynthesis.
In: Proc. 8th Congr. Int. Diab. Fed., Hrsg.: J. Pirart und W.J. Malaisse Amsterdam 1973

STOLL, R.W., TOUBER, J.L., ENSINCK, J.W., WILLIAMS, R.H.:
Substances immunologically related to proinsulin or connecting peptide in swine plasma.
Horm. Metab. Res. 2, 153 (1970a)

STOLL, R.W., TOUBER, J.L., ENSINCK, J.W., WILLIAMS, R.H.:
Proinsulin and connecting peptide in swine plasma.
Clin. Res. 18, 172 (1970b)

STOLL, R.W., TOUBER, J.L., MENAHAN, L.H., WILLIAMS, R.H.:
Clearance of porcine insulin, proinsulin and connecting peptide by the isolated rat liver.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 3, 894 (1970c)

TAGER, H.S., STEINER, D.F.:
Primary structures of the proinsulin connecting peptides of the rat and the horse.
J. Biol. Chem. 247, 7936 (1972)

TAGER, H.S., EMDIN, S.O., CLARK, J.L., STEINER, D.F.:
Studies on the conversion of proinsulin to insulin. II. Evidence for a chymotrypsin-like cleavage in the connecting peptide region of insulin precursors in the rat.
J. Biol. Chem. 248, 3476 (1973)

TAYLOR, K.W., PARRY, D.G.: The incorporation of tritium-labeled amino acids into insulin in ox pancreas in vitro. Biochem. J. 89, 94 (1963)

TERRIS, S., STEINER, D.F.: Binding and degradation of ^{125}J-insulin by rat hepatocytes. J. Biol. Chem. 250, 8289 (1975)

TOMPKINS, C.V., SRIVASTA, M.C., SÖNKSEN, P.H., NABARRO, J.D.N.: A comparative study of the distribution and metabolism of monocomponent insulin and porcine proinsulin in man. Biochem. J. 125, 64 (1971)

TOYOTA, T., ABE, K., KUDO, M., KIMURA, K., GOTO, Y.: Inhibitory effects of synthetic rat C-peptide 1 on insulin secretion in the isolated perfused rat pancreas. Tohoku J. Exp. Med. 117, 79 (1975)

TRACK, N.S., FERICHS, H., CREUTZFELDT, W.: Release of newly synthesized proinsulin and insulin from granulated and degranulated isolated rat pancreatic islets. Horm. Metab. Res. 7 (Suppl. 5), 97 (1975)

VARANDANI, P.T., NAFZ, M.N.: Insulin degradation. XVI. Evidence for the sequential degradation pathway in isolated liver cells. Diabetes 25, 173 (1976)

VAUGHAN, M., ANFINSEN, C.B.: Non uniform labeling of insulin and ribonuclease synthesized in vitro. J. Biol. Chem. 211, 367 (1954)

VRONTAKIS, M., SOUVATHGLOU, A., KOUTRAS, D.A.: The effect of glibenclamide on serum glucose, insulin and C-peptide in obesity. Proc. 1st. Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977,Hrsg.: J.Beyer, U. Krause, W. Naegele

WIESINGER, H., ZILKER, TH., ERMLER, R., BOTTERMANN, P.: C-peptide after i.v. glucose in subjects with variable degrees of renal function impairment with special emphasis to glucose tolerance. Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977,Hrsg.: J. Beyer, U. Krause, W. Naegele

WÖLK, I., ZILKER, TH., SCHWEIGART, U., KRÄNZLEIN, TH., ERMLER, R., PATEREK, P., BOTTERMANN, P.: Quantitative estimation of C-peptide and insulin secretion as a basis for the correct therapeutic measures in diabetes mellitus. Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977, Hrsg.: J. Beyer, U.Krause, W. Naegele

WOJCIKOWSKI, CZ., FUSSGÄNGER, R.D., MAIER, V., DOMINIAK, K., PFEIFFER, E.F.: Effect of synthetic C-peptide on insulin secretion in rat. Diabetologia 14, 282 (1978) (Abstract)

WOJCIKOWSKI, CZ., FUSSGÄNGER, R.D., PFEIFFER, E.F.: Inhibition of insulin and glucagon secretion of the isolated perfused rat pancreas by synthetic human and rat C-peptide. Proc. 1st Int. Symp. C-peptide, Mainz 1977,Hrsg.: J.Beyer, U. Krause, W. Naegele

WRENSHALL, G.A., BOGOCH, A., RITCHIE, R.C.: Extractable insulin of pancreas. Diabetes 1, 87 (1952)

YALOW, R.S.: Application of radioimmunological methods to problems in insulin antigenicity and hormone assay. In: Insulin, Hrsg.: R. Luft Acta Medica Scand. Suppl.601, 151 (1977)

YALOW, R.S.,
BERSON, S.A.:
Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.
Nature 184, 1648 (1959)

YANAIHARA, N.,
HASHIMOTO, T.,
YANAIHARA, C.,
SAGAKAMI, N.,
STEINER, D.F.,
RUBENSTEIN, A.H.:
Synthesis of human connecting peptide derivatives and their immunological properties.
Biochem. biophys. Res. Comm. 59, 1124 (1974)

11. ANHANG (Tabellen und Abbildungen)

a) Probanden der Untersuchung

Lfd. Nr.	m/w	Alter	Größe	Gewicht	Kollektiv	Therapie
1	w	51	172	69	KO	
2	w	25	160	46	KO	
3	m	30	191	81	KO	
4	m	26	180	66	KO	
5	m	25	193	73	KO	
6	w	53	154	59	KO	
7	w	42	165	61	KO	
8	w	56	170	65	KO	
9	m	55	185	86	ED	Euglucon 5: 2-0-1 Silubin ret.: 1-0-1
10	m	55	174	79	ED	Euglucon 5: 2-0-1
11	w	71	160	58	ED	Euglucon 5: 2-0-1
12	w	73	165	64	ED	Euglucon 5: 2-0-1
13	w	60	164	59	ED	Euglucon 5: 2-0-1 Silubin ret.: 1-0-1
14	m	16	178	69	ID	Depot CR 34 + 6 E
15	w	40	165	63	ID	Depot CR 24 + 6 E
16	w	63	151	46	ID	Leo Retard 40 + 20 E
17	m	42	181	74	ID	Depot CS 32 + 16 E
18	w	15	167	47	ID	Depot CS 12 E

b) Kollektive Daten der untersuchten Personen

	KO	ED	ID
Körpergewicht (kg)	65,1 ± 10,3	69,2± 11,5	60,8 ± 13,4
Rel. Körpergewicht (Broca, %)	96,5 ± 14,9	105 ± 5,0	94,3 ± 10,7

Tabelle 10 a und b: Individuelle (a) und kollektive (b) Daten der untersuchten Personen (b: $\bar{x} \pm SD$)

1. Eingewogenes C-Peptid: 1,25 ng/ml

Harnstoff (ng/ml)	Wdfdg. (%)	CPR (ng/ml)
625	80,8	1,01
1250	88,0	1,10
2500	88,8	1,11
4000	104,0	1,30

2. Eingewogenes C-Peptid: 2,5 ng/ml

625	83,2	2,08
1250	88,8	2,22
2500	94,0	2,35
4000	102,0	2,55

Tabelle 11: Wiederfindung eingewogenen C-Peptids in Phosphatpuffer pH 7,4 mit 0,5g/dl Humanalbumin in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration

Urin

a) DF (nativ: 5,6 ng/ml)

1,5	95,4 %
2	89,3 %
3	96,4 %
4	110,7 %

b) DF (nativ: 4,5 ng/ml)

1,5	101,3 %
3	93,4 %
6	102,0 %
12	105,0 %
24	117,0 %
	(unter Nachweisgrenze)

c) DF (nativ: 8,5 ng/ml)

2	117,6 %
4	127,0 %
8	122,0 %
16	137,4 %
32	131,8 %

Serum

c) DF (nativ: 4,2 ng/ml)

1,5	100,7 %
3	93,3 %
4	108,0 %
8	90,6 %
16	92,5 %

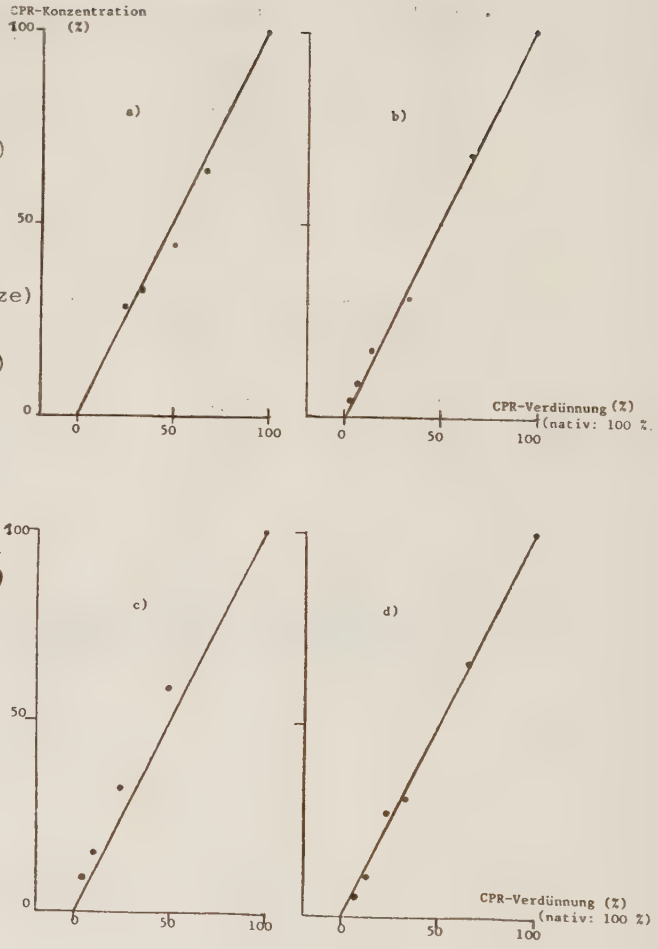

Tabelle 12 a-d: C-Peptid-Konzentration bei Verdünnung verschiedener Urine (a - c) sowie zum Vergleich einer Serumprobe (d). Nativkonzentration des CPR = 100 %. Werte errechnet aus Nativkonzentration x Verdünnungsfaktor (DF).

Rechte Hälfte: Entspr. grafische Darstellung von a - d

C-Peptid i.S.	7:00		10:00		14:00		21:00	
	ng/ml	nmol/l	ng/ml	nmol/l	ng/ml	nmol/l	ng/ml	nmol/l
Kontrollgruppe								
AM + SD	2,96	0,98	4,33	1,43	5,40	1,8	4,49	1,49
AM + SEM	2,48	0,82	3,66	1,21	4,20	1,39	3,80	1,25
AM	2,25	0,74	3,33	1,10	3,66	1,21	3,47	1,15
AM - SEM	2,04	0,67	3,04	1,0	3,19	1,05	3,17	1,05
AM - SD	1,71	0,57	2,57	0,85	2,48	0,82	2,68	0,89
n	8 x 6		8 x 6		8 x 6		8 x 6	
Erwachsene Diabetiker								
AM + SD	6,70	2,21	10,76	3,56	12,88	4,26	9,89	3,27
AM + SEM	5,66	1,87	7,20	2,38	8,86	2,93	7,66	2,53
AM	4,94	1,63	5,20	1,72	6,58	2,17	6,24	2,06
AM - SEM	4,31	1,42	3,76	1,24	4,87	1,61	5,08	1,68
AM - SD	3,65	1,20	2,51	0,83	3,36	1,11	3,94	1,30
n	5 x 6		5 x 6		5 x 6		5 x 6	
Juvenile Diabetiker								
AM + SD	1,41	0,47	1,63	0,54	2,85	0,94	2,05	0,68
AM + SEM	0,99	0,33	1,08	0,36	1,84	0,61	1,33	0,44
AM	0,75	0,25	0,78	0,26	1,30	0,43	0,94	0,31
AM - SEM	0,56	0,18	0,56	0,18	0,91	0,30	0,66	0,22
AM - SD	0,40	0,13	0,37	0,12	0,59	0,20	0,43	0,14
n	(5 x 6)-1		5 x 6		5 x 6		5 x 6	

Tabelle 13: CPR-Konzentration im Serum

Insulin uU/ml		7:00	10:00	14:00	21:00
Kontrollgruppe					
Antilog	AM + SD	11,53	20,89	25,12	24,77
	AM + SEM	9,10	16,39	20,58	17,80
	AM	8,00	14,35	18,45	14,86
	AM - SEM	7,03	12,57	16,54	12,40
	AM - SD	5,55	9,86	13,55	8,91
	n	8 x 6	8 x 6	8 x 6	8 x 6
Erwachsene Diabetiker					
Antilog	AM + SD	40,09	77,62	94,19	76,03
	AM + SEM	28,25	54,28	65,12	50,53
	AM	21,28	40,64	48,31	36,31
	AM - SEM	16,03	30,43	35,84	26,09
	AM - SD	11,30	21,28	24,77	17,34
	n	5 x 6	5 x 6	5 x 6	5 x 6

Tabelle 14: IRI-Konzentrationen im Serum

		C-Peptid im Harn über 24 Std. (ng)
	Antilog	
Kontrollgruppe		
	AM + SD	53.951,06
	AM + SEM	47.397,90
	AM	44.157,04
	AM - SEM	41.137,78
	AM - SD	36.140,99
	n	8 x 6
Erwachsene Diabetiker		
	AM + SD	76.736,15
	AM + SEM	63.157,32
	AM	53.951,06
	AM - SEM	46.066,78
	AM - SD	37.931,50
	n	5 x 6
Juvenile Diabetiker		
	AM + SD	47.315,13
	AM + SEM	21.601,48
	AM	11.455,13
	AM - SEM	6.074,58
	AM - SD	2.773,32
	n	5 x 6

Tabelle 15: CPR im Harn/24 Std.

	Antilog	CPH1:7:00-13:00	CPH2:13:00-19:00	CPH3:19:00-23:00	CPH4:23:00-7:00
Kontrollgruppe					
KO	AM + SD	17.701,09	16.143,59	13.182,57	12.823,31
	AM + SEM	11.125,22	13.263,83	10.342,59	9.408,91
	AM	8.629,79	11.912,42	9.057,33	7.943,28
	AM - SEM	6.694,09	10.698,70	7.931,78	6.705,96
	AM - SD	4.207,27	8.790,23	6.223,00	4.920,40
	n	8 x 6	8 x 6	8 x 6	8 x 6
Erwachsene Diabetiker					
ED	AM + SD	19.098,53	21.330,45	19.860,95	22.542,39
	AM + SEM	10.648,07	11.968,37	10.685,46	17.610,00
	AM	6.637,43	7.498,94	6.471,43	14.421,15
	AM - SEM	4.137,41	4.698,56	3.919,29	11.809,75
	AM - SD	2.306,75	2.636,33	2.108,63	9.225,71
	n	5 x 6	5 x 6	5 x 6	5 x 6
Juvenile Diabetiker					
ID	AM + SD	4.988,84	16.143,59	8.491,80	8.912,51
	AM + SEM	2.452,14	7.139,44	3.519,43	4.147,39
	AM	1.380,38	3.689,78	1.725,84	2.233,57
	AM - SEM	777,06	1.906,94	846.31	1.202,89
	AM - SD	381,94	843,33	350,75	559,76
	n	5 x 6	5 x 6	5 x 6	5 x 6

Tabelle 16: CPR im Harn in Einzelfraktionen I - IV

	Antilog	CPH12 7:00-19:00 (ng)	CPH34 19:00-7:00 (ng)
Kontrollgruppe			
	AM + SD	30.902,95	24.774,22
	AM + SEM	26.079,85	20.783,53
	AM	23.768,40	18.879,91
	AM - SEM	21.661,82	17.150,65
	AM - SD	18.281,00	14.387,99
	n	8 x 6	8 x 6
Diabetiker vom Erwachsenentyp			
	AM + SD	35.645,11	40.364,54
	AM + SEM	27.319,18	32.635,08
	AM	22.029,26	27.478,94
	AM - SEM	17.763,66	23.137,44
	AM - SD	13.614,45	18.706,82
	n	5 x 6	5 x 6
Diabetiker vom juvenilen Typ			
	AM + SD	24.490,63	20.464,45
	AM + SEM	11.338,73	9.096,52
	AM	6.081,35	4.720,63
	AM - SEM	3.261,64	2.449,77
	AM - SD	1.510,08	1.088,93
	n	5 x 6	5 x 6

Tabelle 17: CPR im Harn, I + II und III + IV

C-Peptid-Fläche (Antilog)

KO	AM + SD	67,61
	AM + SEM	51,11
	AM	48,75
	AM - SEM	46,51
	AM - SD	35,16
	n	48
ED	AM + SD	148,59
	AM + SEM	94,41
	AM	85,31
	AM - SEM	77,09
	AM - SD	48,98
	n	30
ID	AM + SD	31,84
	AM + SEM	17,28
	AM	15,03
	AM - SEM	13,08
	AM - SD	7,10
	n	29

Tabelle 18: Fläche unter der Kurve des CPR im Serum (Antilog)

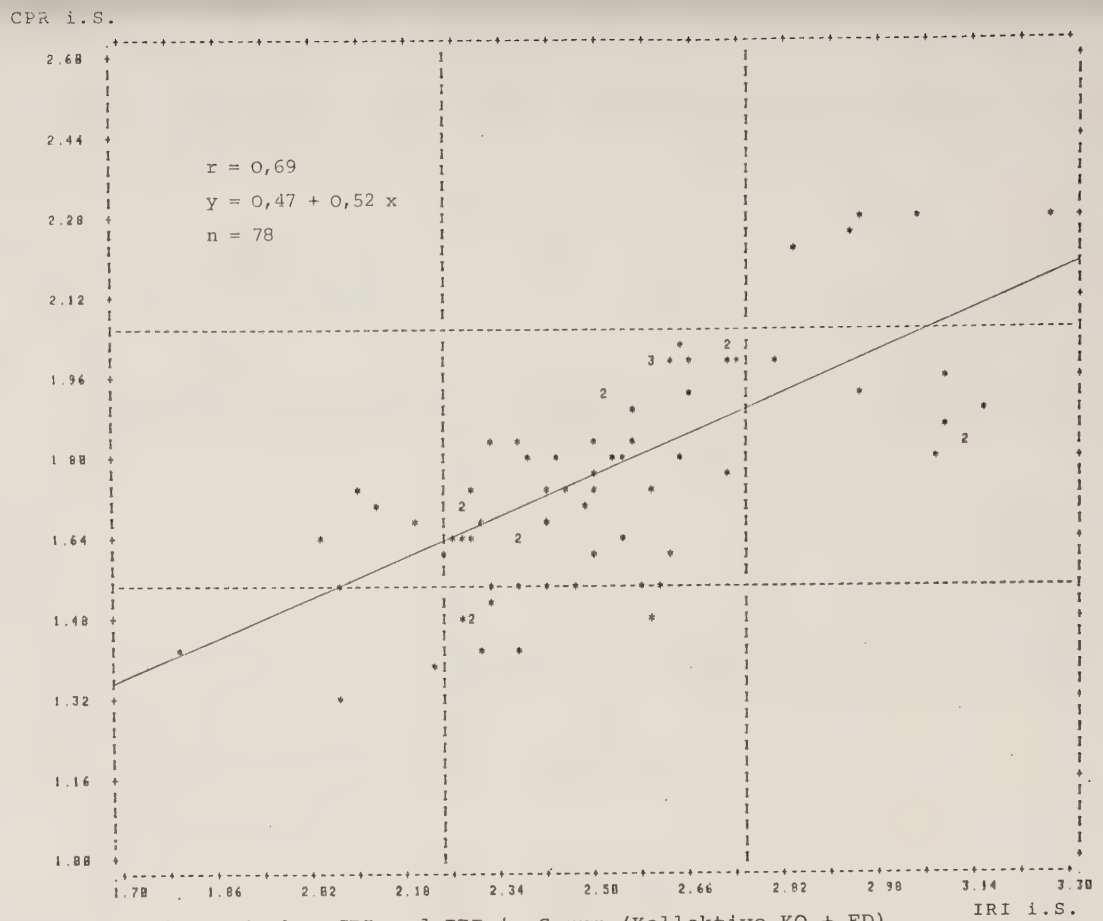

Abbildung16 a - e: Korrelation zwischen CPR und IRI im Serum (Kollektive KO + ED)
a) Flächen; b) 7:00 Uhr; c) 10:00 Uhr; d) 14:00 Uhr; e) 21:00 Uhr

a) Flächen

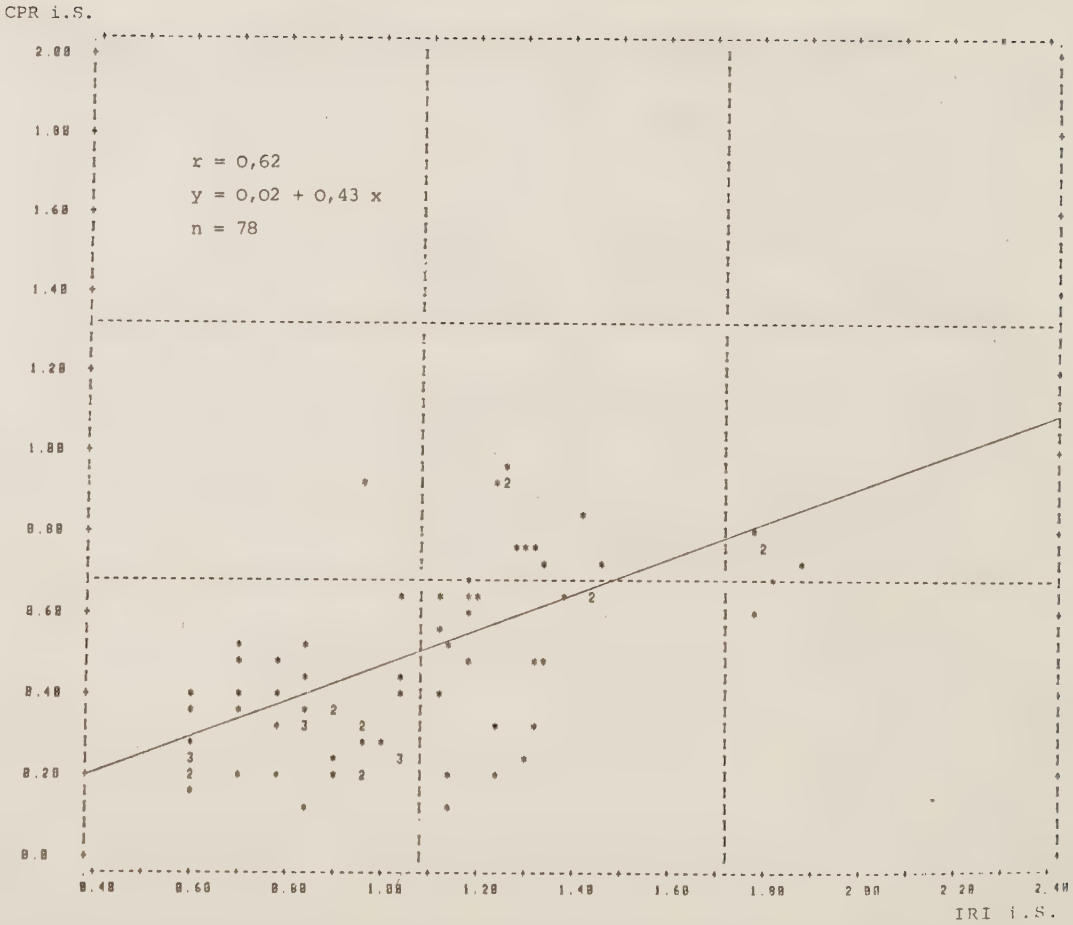

Abbildung 16 a - e:
b) 7:00 Uhr

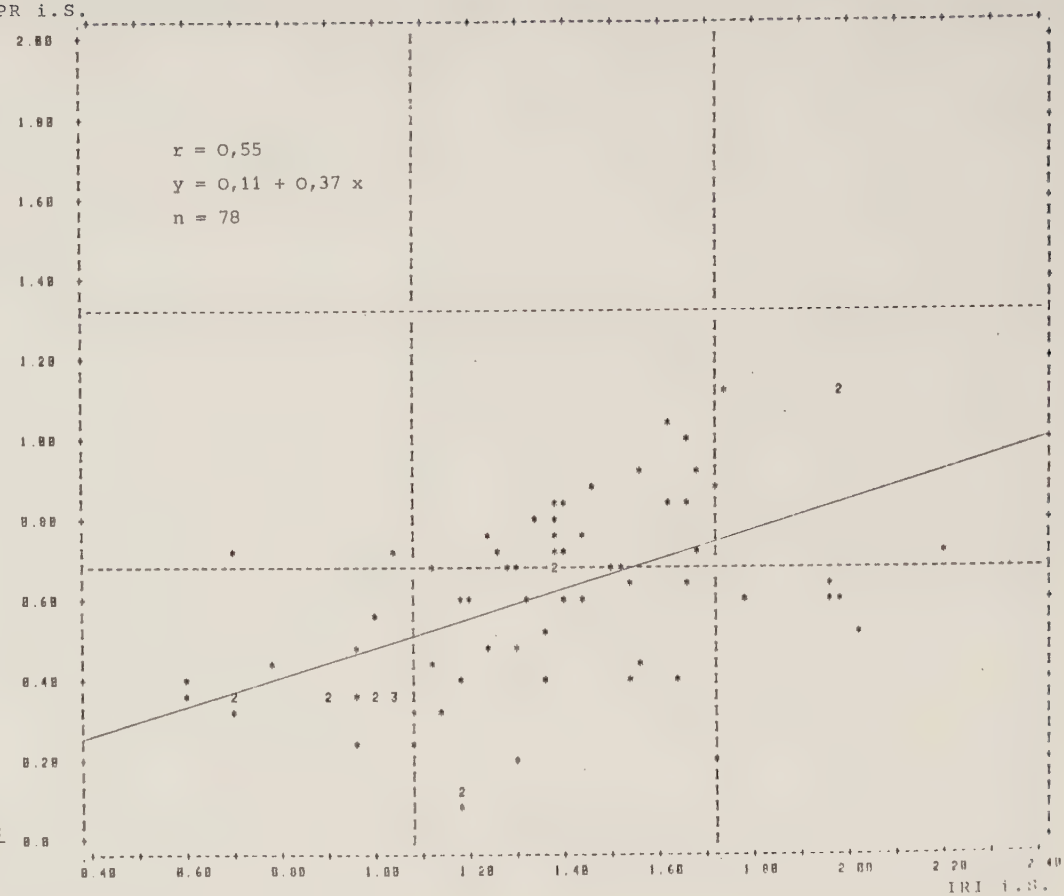

Abbildung 16 a - e:

c) 10:00 Uhr

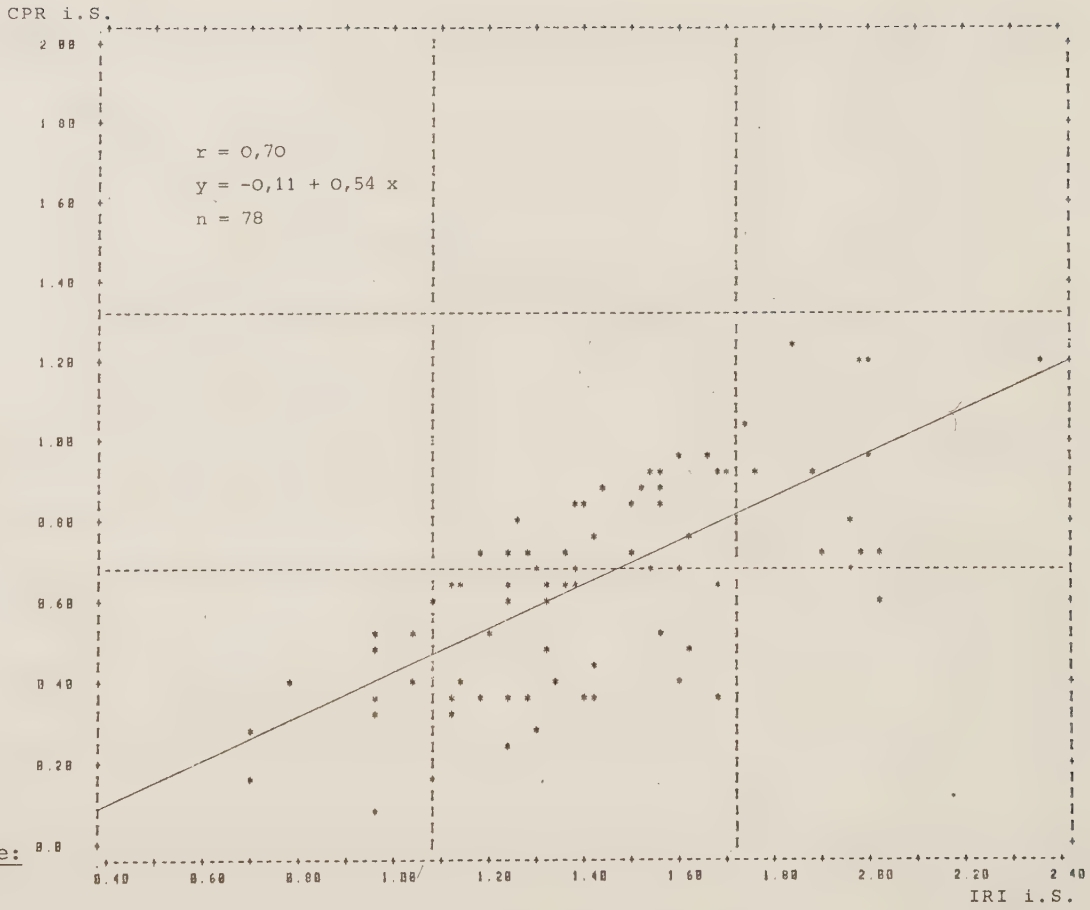

Abbildung 16 a - e:
d) 14:00 Uhr

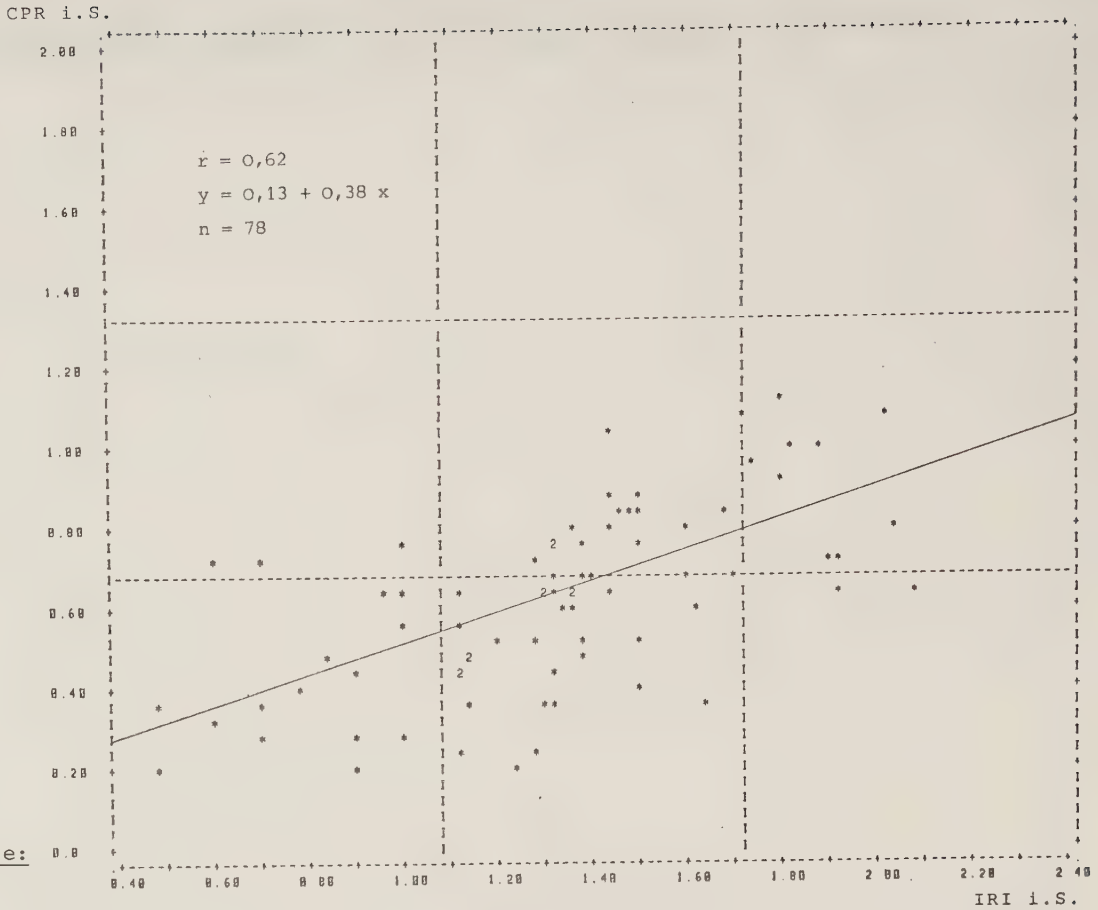

Abbildung 16 a - e:

e) 21:00 Uhr

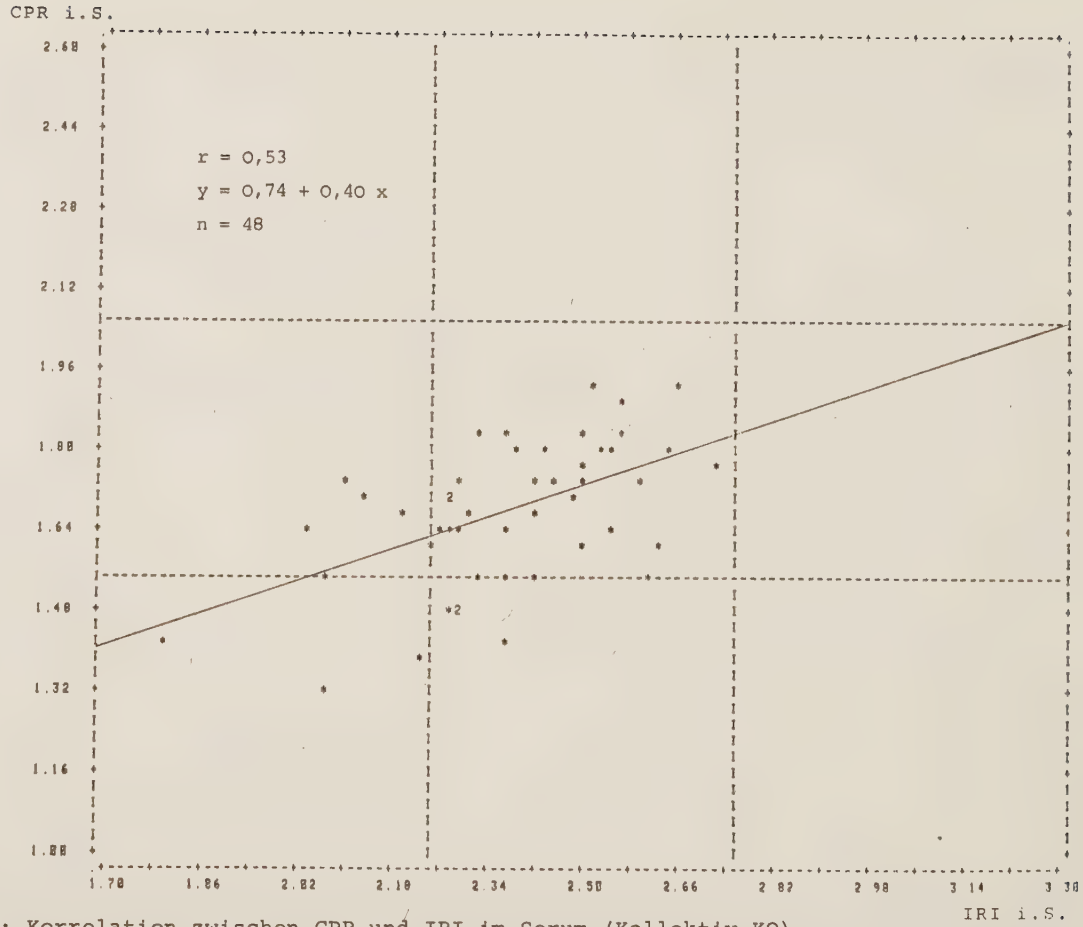

Abbildung 17 a - e: Korrelation zwischen CPR und IRI im Serum (Kollektiv KO)
a) Flächen; b) 7:00 Uhr; c) 10:00 Uhr; d) 14:00 Uhr; e) 21:00 Uhr

a) Flächen

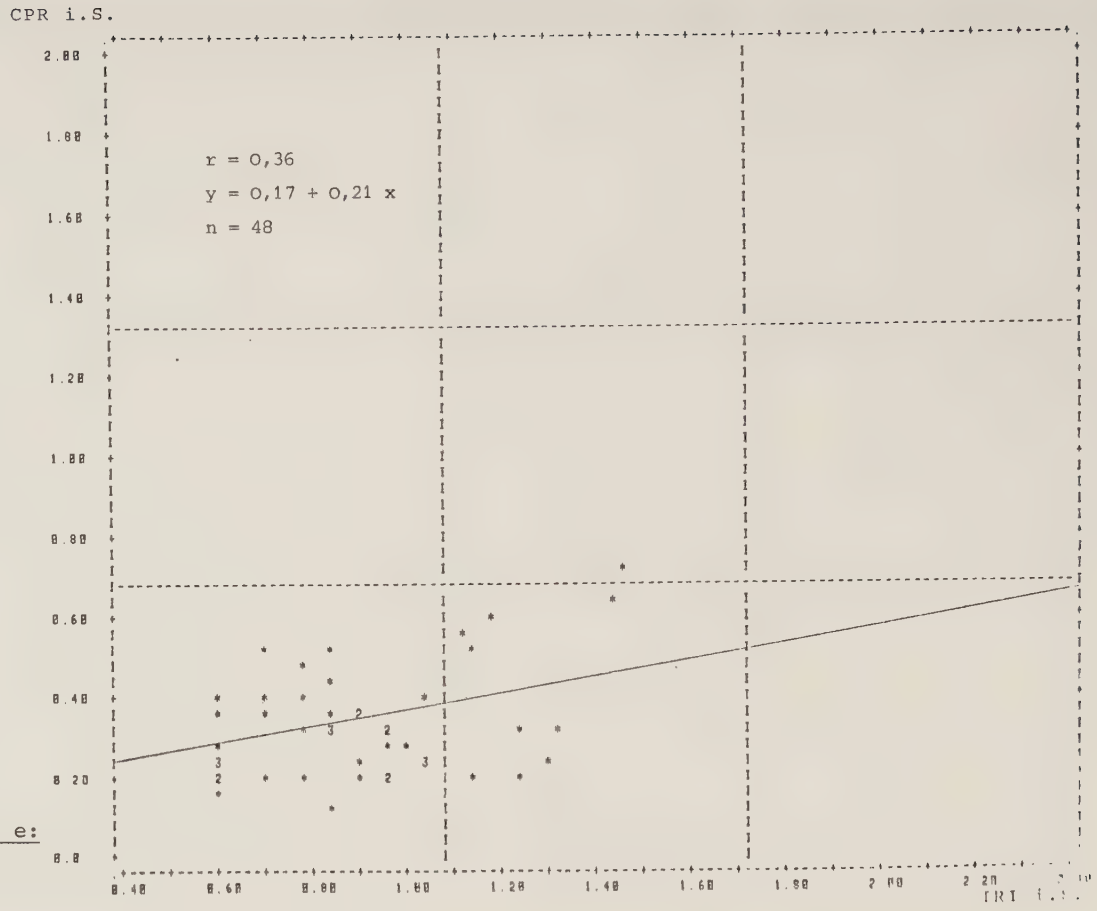

Abbildung 17 a - e:

b) 7:00 Uhr

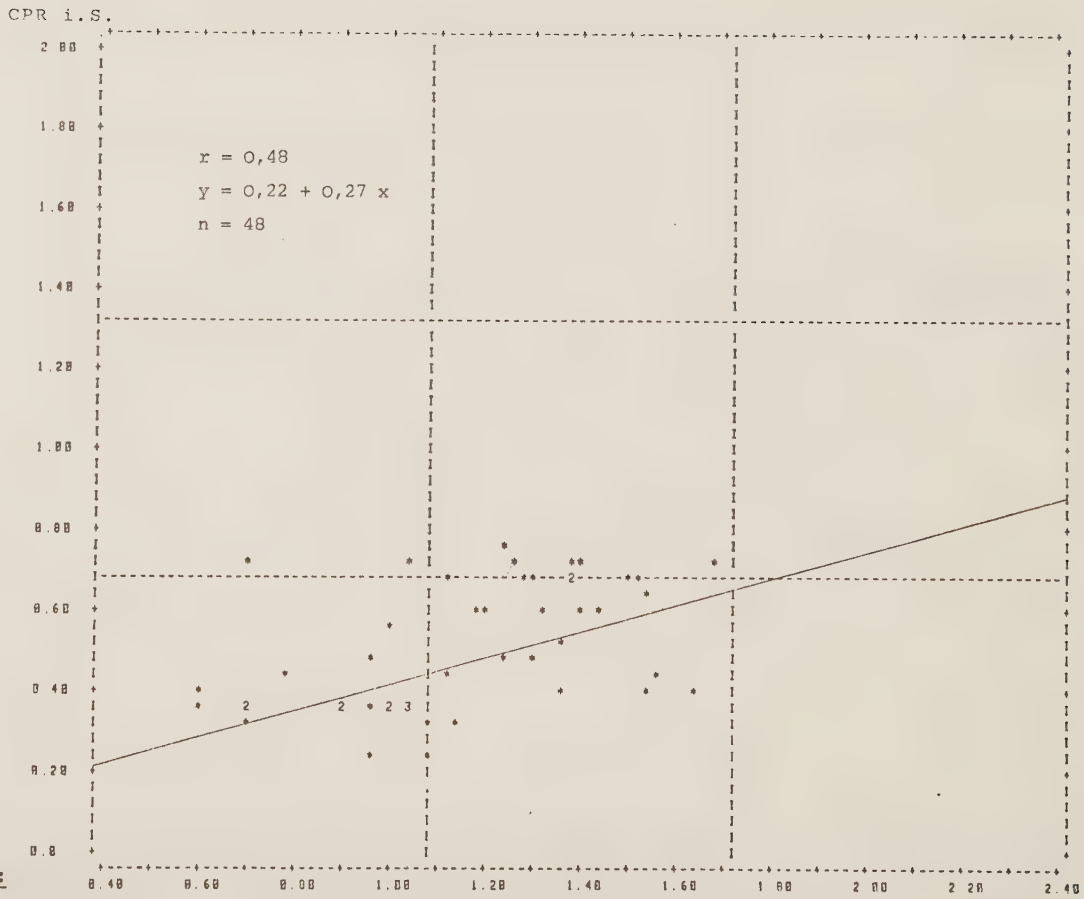

Abbildung 17 a - e:

c) 10:00 Uhr

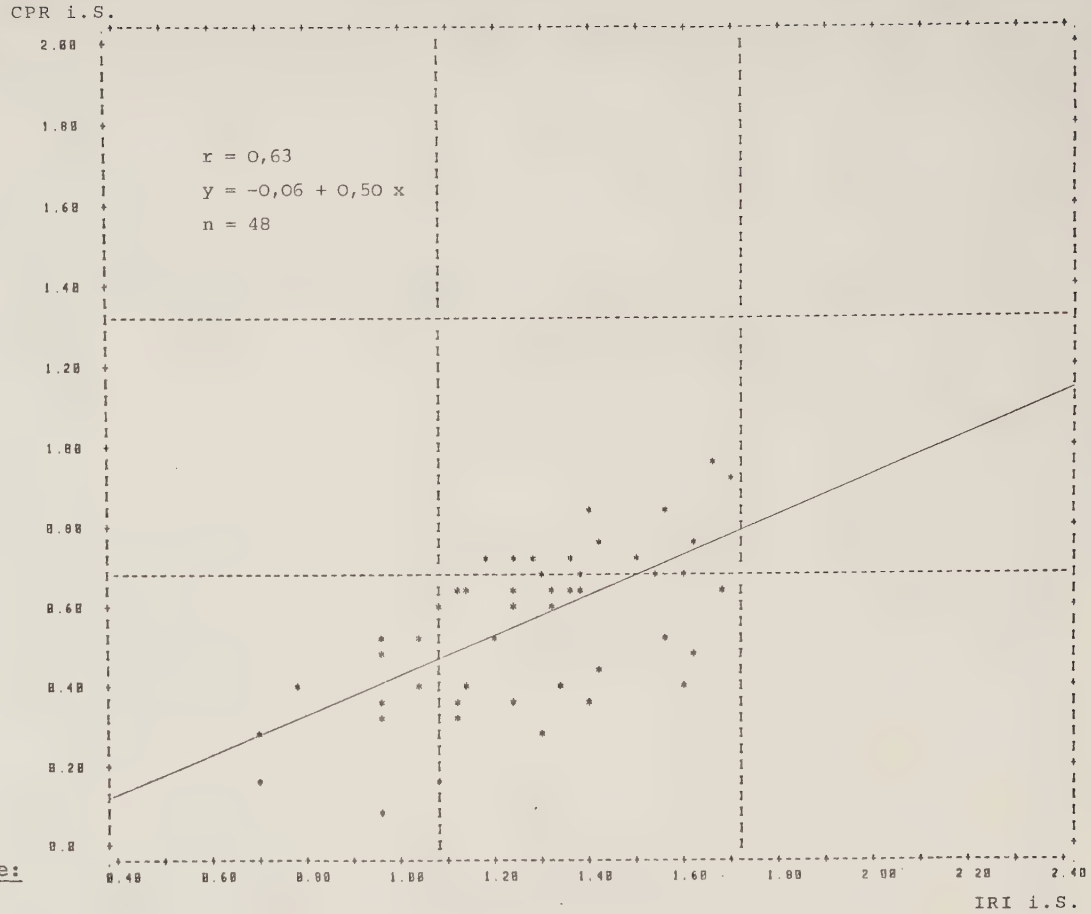

Abbildung 17 a - e:

d) 14:00 Uhr

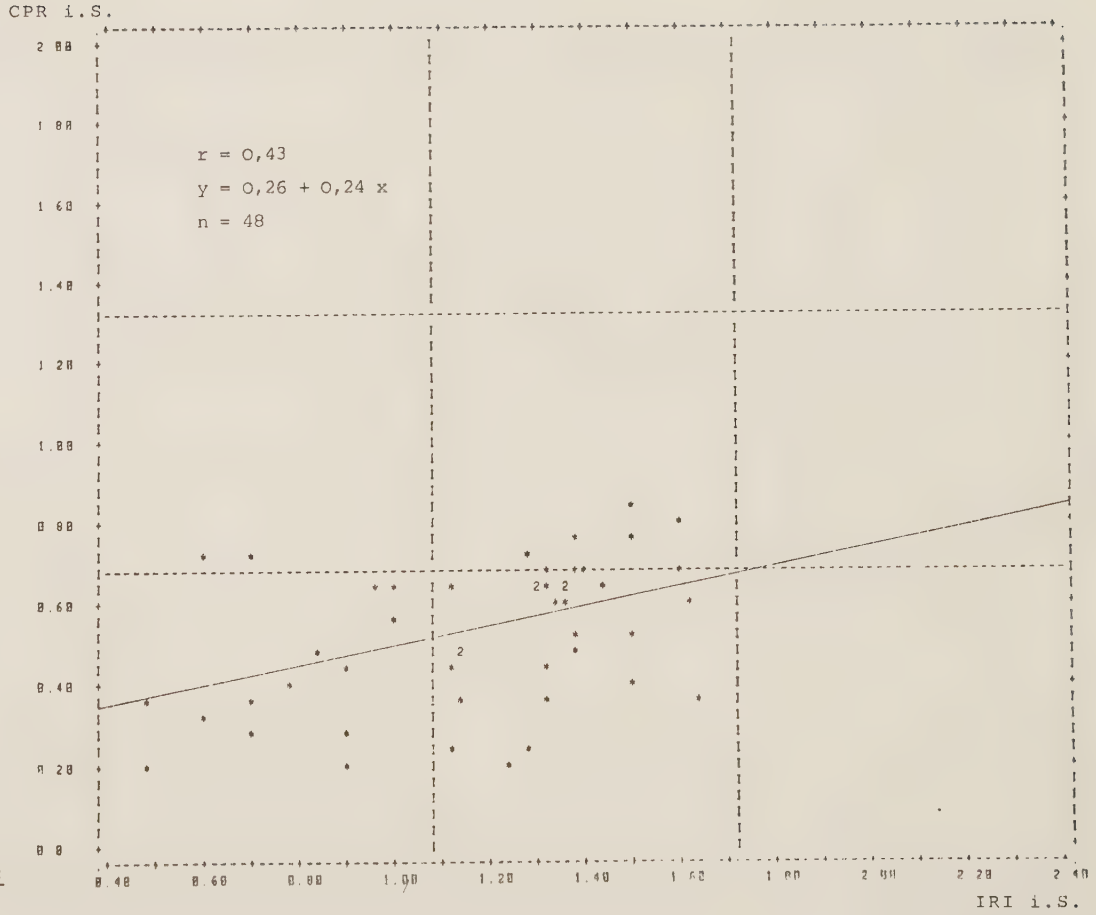

Abbildung 17 a - e:

e) 21:00 Uhr

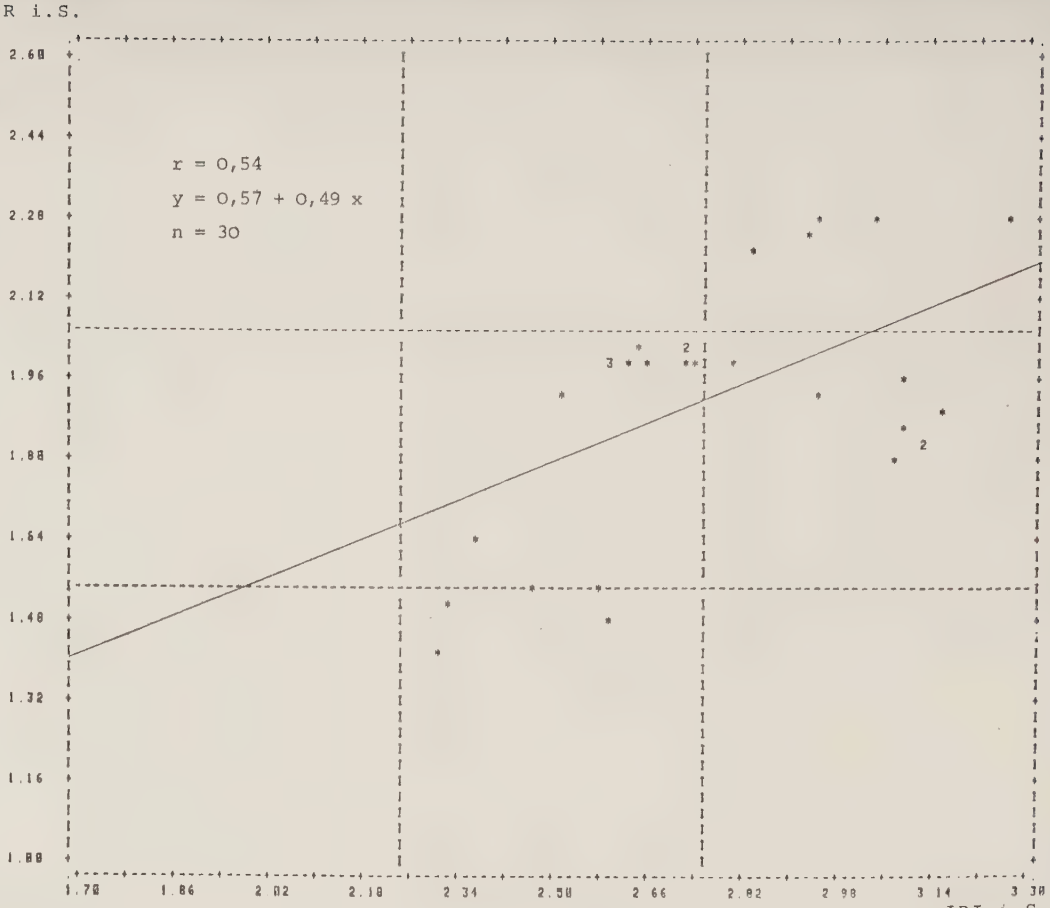

Abbildung 18 a - e: Korrelation zwischen CPR und IRI im Serum (Kollektiv ED)
a) Flächen; b) 7:00 Uhr, c) 10:00 Uhr; d) 14:00 Uhr; e) 21:00 Uhr

a) Flächen

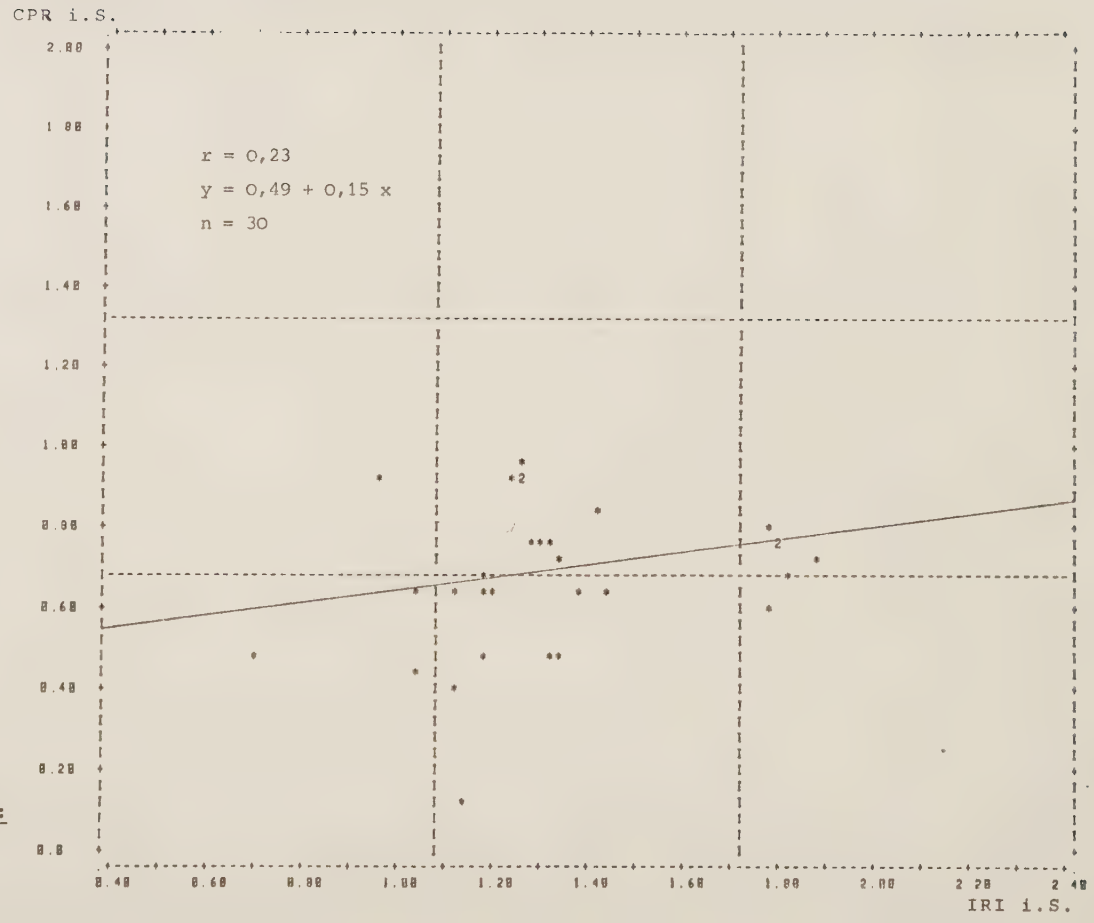

Abbildung 18 a - e:

b) 7:00 Uhr

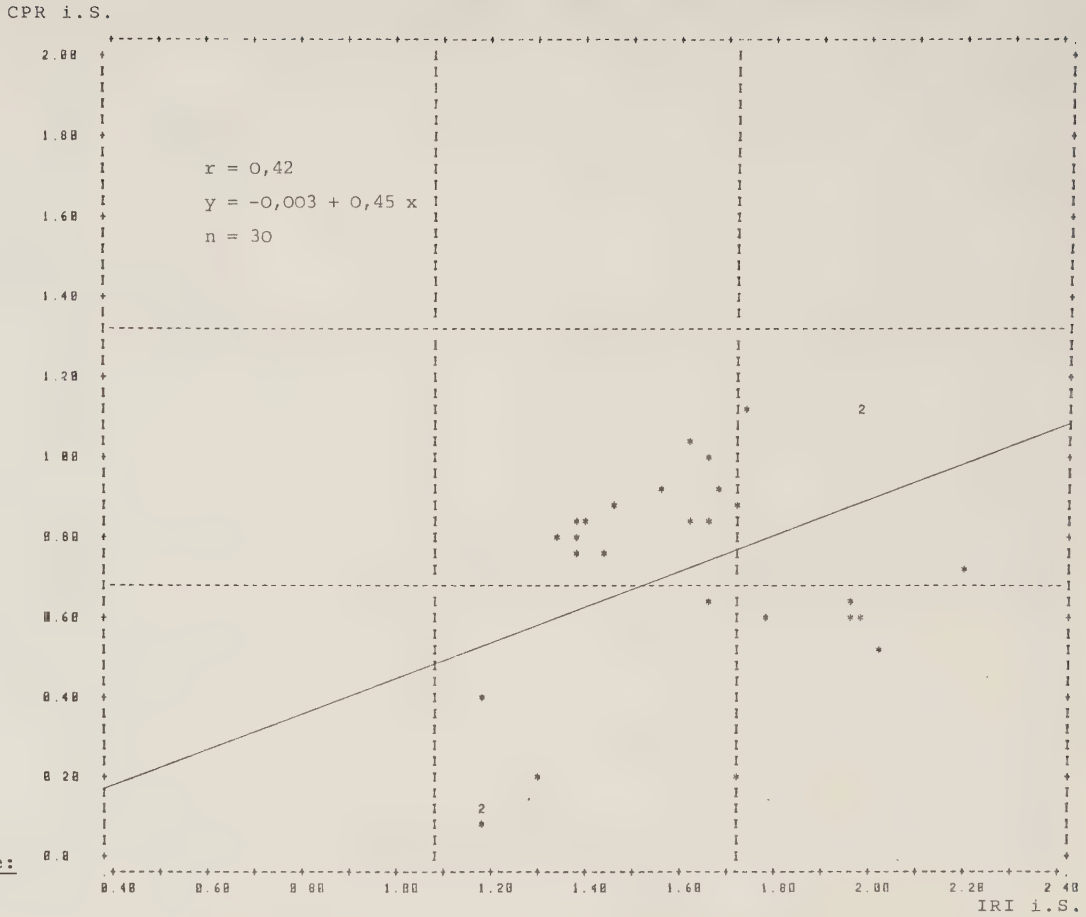

Abbildung 18 a - e:

c) 10:00 Uhr

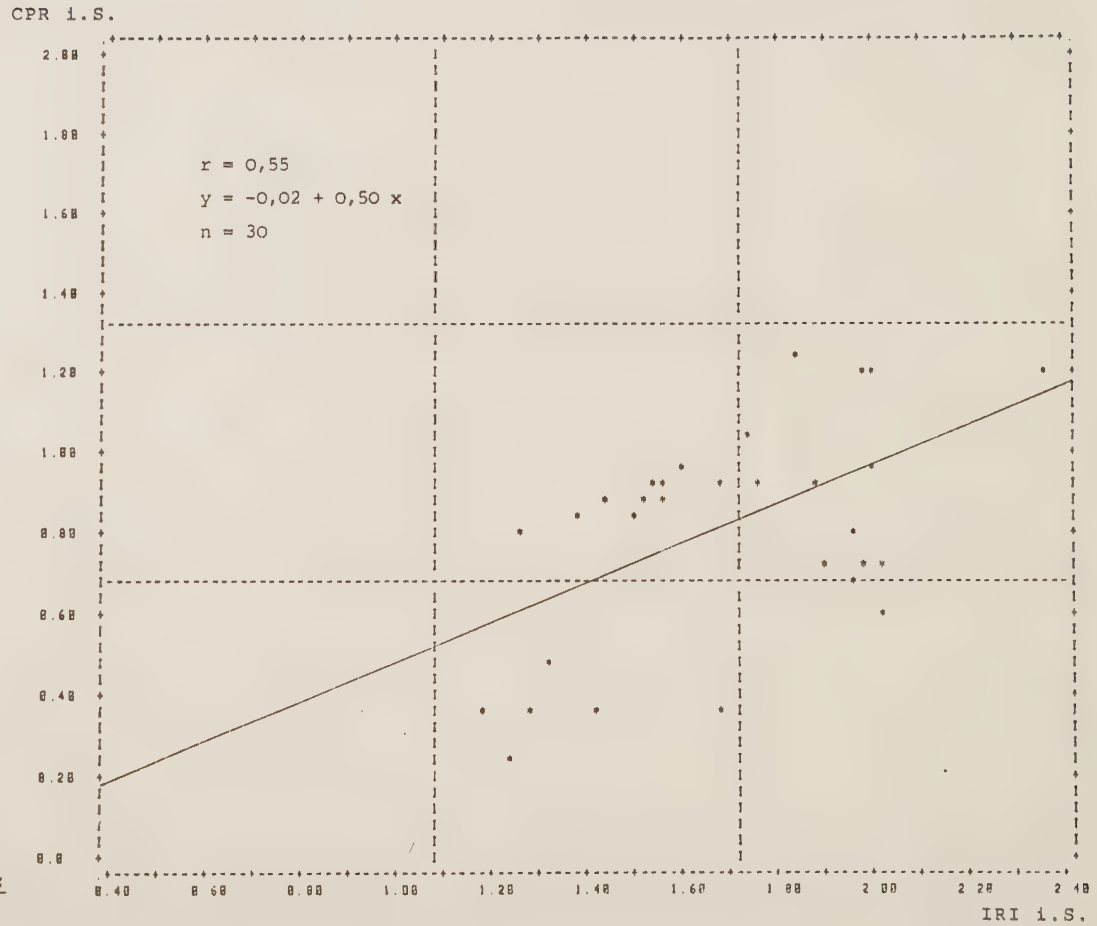

Abbildung 18 a - e:

d) 14:00 Uhr

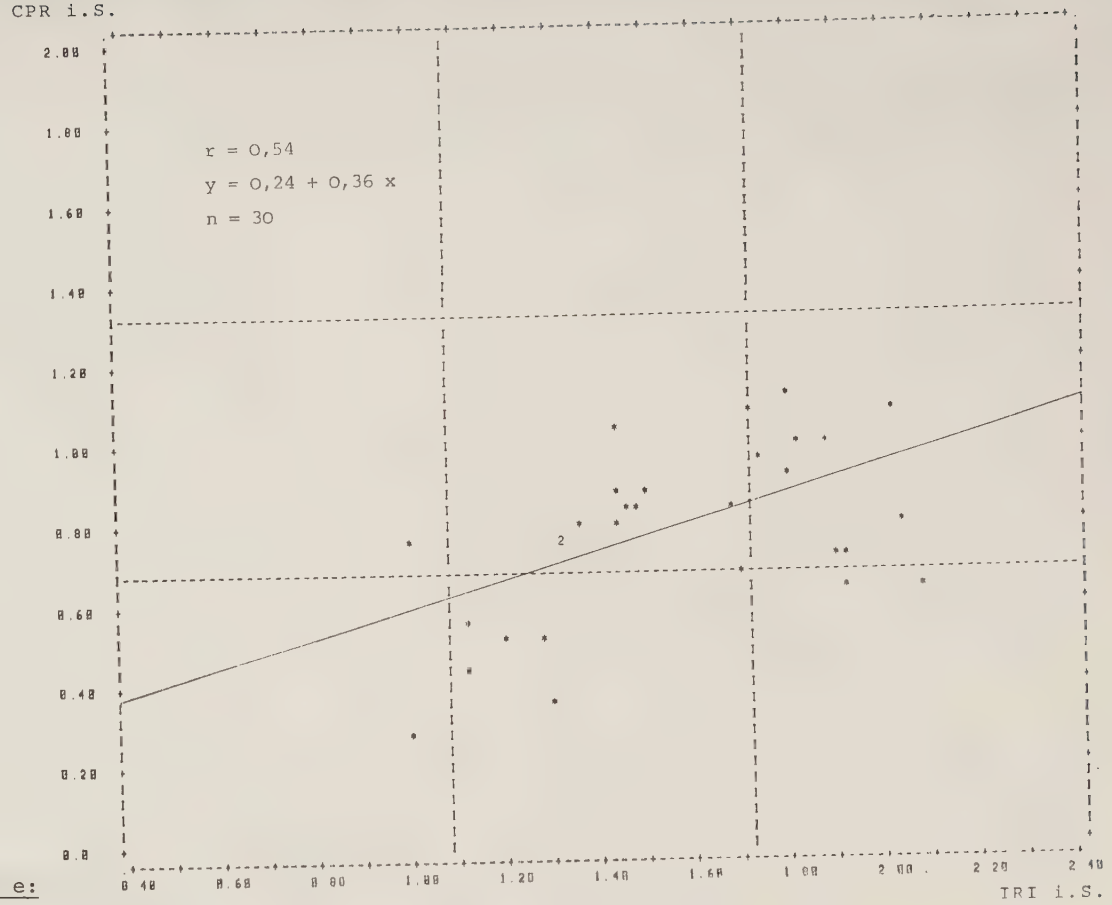

Abbildung 18 a - e:

e) 21:00 Uhr

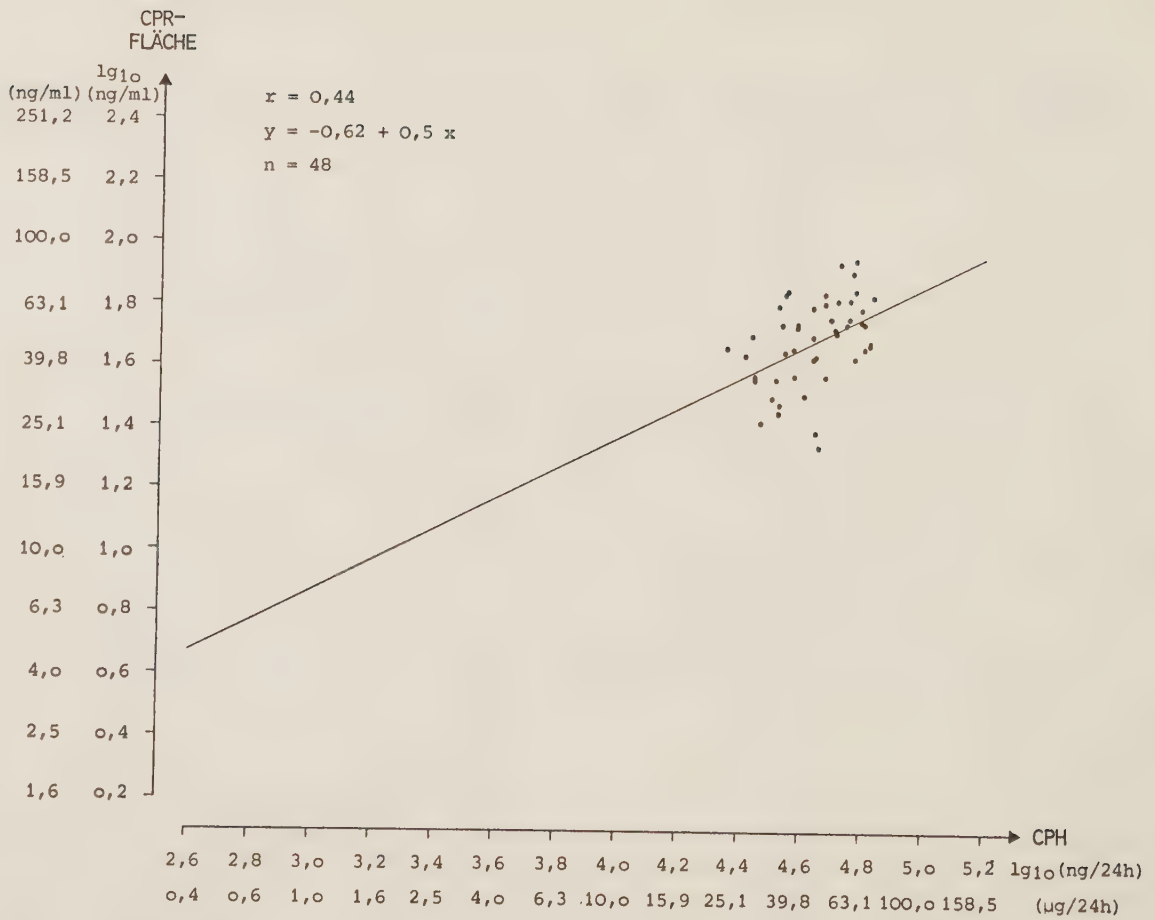

Abbildung 19: Korrelation zwischen der Fläche unter der Kurve des C-Peptid im Serum und der C-Peptidausscheidung im Harn/24 Std. (Kollektiv KO)

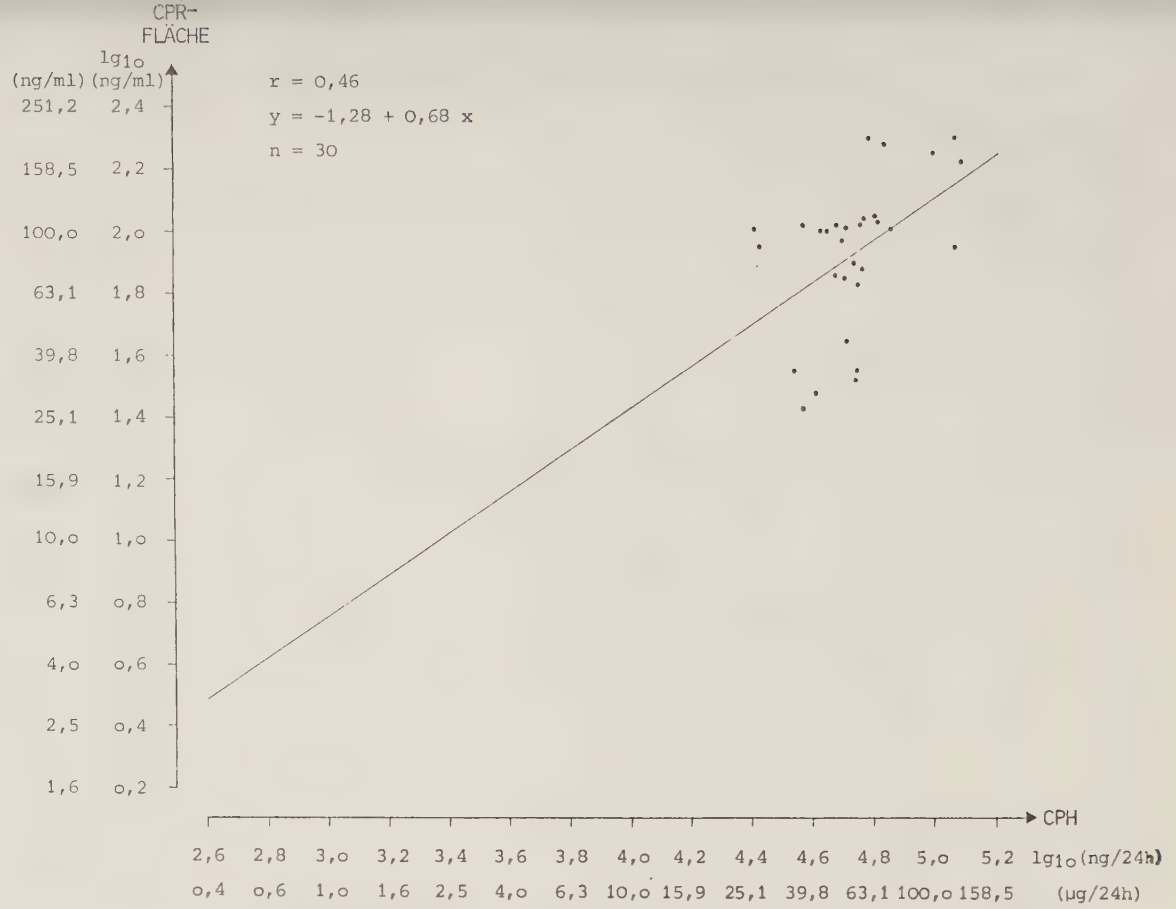

Abbildung 20: Korrelation zwischen der Fläche unter der Kurve des C-Peptid im Serum und der C-Peptidausscheidung im Harn/24 St. (Kollektiv ED)

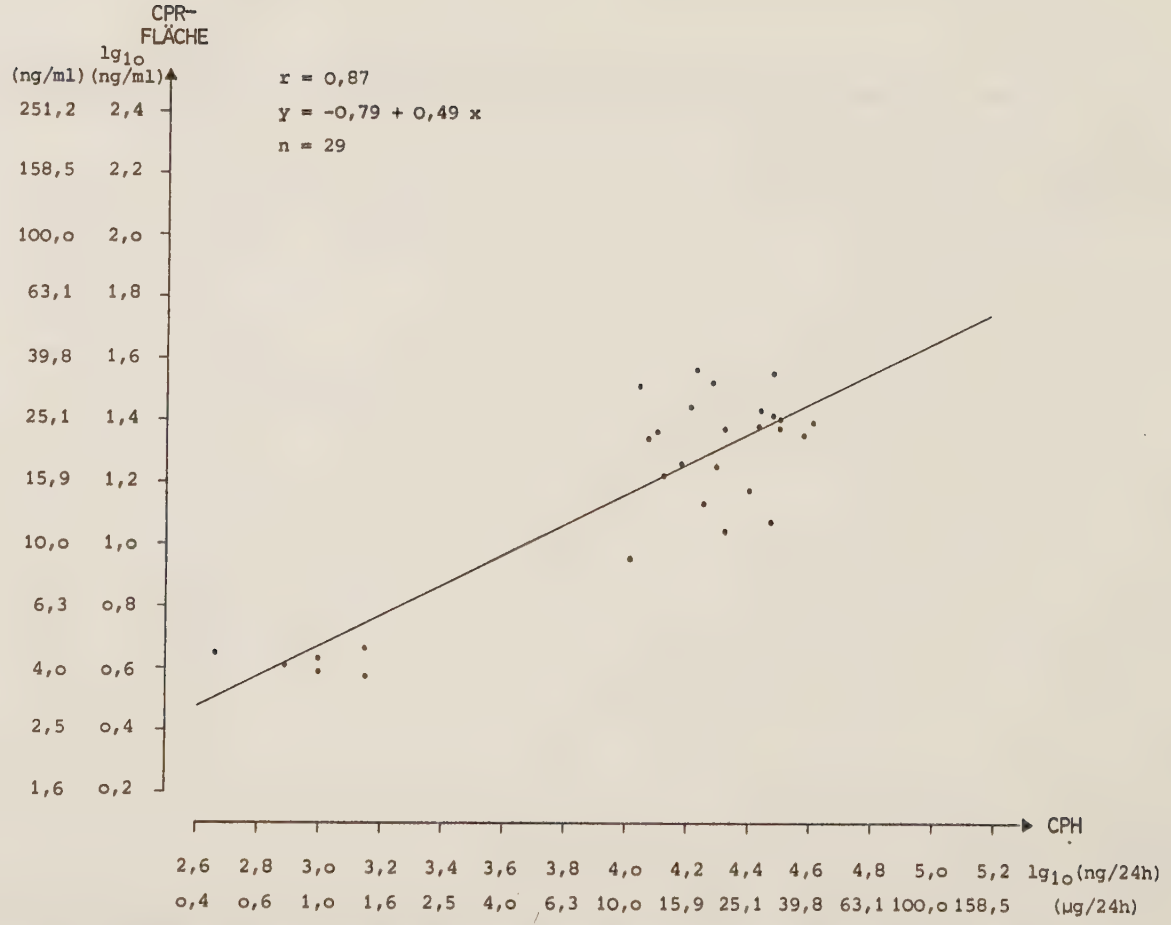

Abbildung 21: Korrelation zwischen der Fläche unter der Kurve des C-Peptid im Serum und der C-Peptidausscheidung im Harn/24 St. (Kollektiv ID)

Mein besonderer Dank gilt allen, die bei der Erstellung dieser Arbeit behilflich waren:

Herrn Prof. Dr. Grüneklee für die Überlassung des Themas und ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Dipl.-Volkswirt Karsten Dannehl für seine umfassende Hilfe bei der Versuchsplanung und methodischen Gestaltung sowie bei der statistischen Auswertung.

Frau Andrea Stübben für die engagierte Unterstützung bei Dokumentation und Statistik.

Den Damen des Insulin-Labors der Klinisch-Experimentellen Gruppe: Frau Eva Vollmoeller, Frau Annette Raane, Frau Adriana van Helden und Frau Gerda Korthaus, ohne deren vielfältige Hilfen bei den laborchemischen Versuchen diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Lebenslauf

7.10.1952	geboren in Schwelm/Westf. als Sohn des Modellbauermeisters Paul Hedtmann und seiner Ehefrau Luise, geb. Hillberger
1959 - 1963	Besuch der Volksschule "Parkort" in Ennepetal
1963 - 1971	Besuch des städtischen neusprachlichen "Reichenbach-Gymnasiums" in Ennepetal
Mai 1971	Abitur
1971 - 1973	Wehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr
April 1973 - Mai 1979	Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf
1975	Ärztliche Vorprüfung
1976	Ärztliche Prüfung, I. Abschnitt
1978	Ärztliche Prüfung , II. Abschnitt
1979	Ärztliche Prüfung, III. Abschnitt Mündliche Prüfung am 15.5.1979
Juni 1979	Approbation als Arzt
seit Juli 1979	Assistenzarzt der chirurgischen Abteilung der Augusta-Kranken-Anstalt in Bochum (Chefarzt: Prof. Dr. St. John)